

## 水稻の光合成・蒸散および乾物生産におけるケイ酸の生理的作用に関する研究

東江, 栄  
九州大学農学研究科農学専攻

<https://doi.org/10.11501/3097516>

---

出版情報：九州大学, 1994, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

## 第4章 ストレス耐性に関与した細胞強度に及ぼすケイ酸の影響

### 1. はじめに

前章では、環境変化に対する個葉ガス交換速度の検討を通して気孔開閉機能に及ぼすケイ酸の影響を検討し、ケイ酸が環境要因の変化に対応した気孔開閉の調節機能に関与していることを明らかにした。ケイ酸欠乏葉身では、拡散伝導度の増大に伴う光合成速度の向上がみられず、気孔を介した過剰蒸散が誘発される可能性が高いと考えられた。第2章で、ケイ酸による乾物生産向上効果の主要因と考えられた葉身の生理的活性の維持（老化抑制）効果は、このような過剰蒸散抑制による水ストレス耐性の向上を介したものと推察された（東江ら，1992；Agarie *et al.*，1993）。

ケイ酸施用と環境ストレス耐性との関係についてはこれまで多くの検討がなされ、ケイ酸施用が、塩（Ahmad *et al.*，1992），乾燥（吉田，1965），放射線（高橋，1966），高低温（岡本，1969a, b），及び有害物質（奥田・高橋，1962a）等のストレスに対する植物体の健全性向上に有効であることが示されている。

ケイ酸によるストレス耐性向上の生理的メカニズムについては、蓄積ケイ酸による細胞の物理的強化からの説明がほとんどである。しかし、これらは各ストレスを個別に、しかも乾物重あるいは生長量といったいわば種々反応の結果を指標とし、細胞強度の実測及びその強化メカニズムの検討はなされていない。

非生物的環境ストレスは、種々の生理作用の機能劣化を招き乾物生産の低下を引き起こす。ストレスの初期段階における標的は細胞の原形質膜であり、ストレスは細胞膜の構造・機能に大きな障害を与える（Steponkus，1980）。例えば、乾燥ストレス下にある葉身では、Hill反応の

低下 (Boyer, 1971), 光合成の光量子収率の減少 (Boyer, 1976), ミトコンドリアの呼吸低下 (Koeppel *et al.*, 1973), 老化の促進 (Boyer, 1976) 及び葉組織からの細胞内容物の漏出 (Gupta, 1977) 等の現象が観察される。環境ストレス下での膜の安定性 (細胞膜強度) は, 植物葉身のストレス耐性を大きく左右すると考えられる。

上述したケイ酸による環境ストレス耐性の向上は, ケイ酸がストレス下の膜安定性向上に関与している可能性を示唆する。ケイ酸による膜機能の安定性向上及びその関連要因に対する関与の明確化は, 各種ストレスに対する耐性向上の生理的メカニズムの一般化, ひいては乾物生産向上に対するケイ酸の生理作用の明確化につながると期待される。

作物の水ストレスに関与した膜安定性の検討には, PEGテストが広く用いられる (Sullivan, 1971・1972)。本法は, ポリエチレングリコール (PEG) 溶液に葉組織を浸漬する *in vitro* の乾燥処理であり, 処理前後の電気伝導度を細胞質 (電解質) の漏出度として評価する方法である。電気伝導度の測定を通して理論的には乾燥による溶質の膜透過性の変動 (膜安定性) を評価することができると考えられている。これまで, 小麦 (Premachandra and Shimada, 1987a; Premachandra and Shimada, 1988), オーチャードグラス (Premachandra and Shimada, 1987b), トウモロコシ (Premachandra *et al.*, 1990), ソルガム (Premachandra *et al.*, 1992) 等, 多くの作物について用いられ細胞膜強度の評価に有効であることが示されている。

本章では, 葉身の生理的活性の維持効果 (老化抑制) を環境ストレス耐性の比較から明らかにすることを目的に, 細胞強度の指標である細胞膜安定性をPEG処理及び熱処理後の電解質の漏出度から評価し, 漏出を左右する諸要因に対するケイ酸の影響を検討する中でケイ酸による細胞強化の機作を明らかにした。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試材料と栽培条件

実験にはコシヒカリの主稈及び一次分げつ着生の止葉を供試した。播種は測定時の葉齢を一定にするため、6月12日、6月17日、7月16日及び8月1日の4回行った。栽培法は第2章2と同様である。

### 2) ケイ酸処理

処理には、水ガラス（ケイ酸ナトリウム）を用い、ケイ酸（ $\text{SiO}_2$ ）0ppm、20ppm、40ppm及び100ppmの4処理区を設けた。

### 3) 電解質漏出度の測定

#### a. ポリエチレングリコール（PEG）処理

主稈及び一次分げつ着生の最上位展開葉を幅1cmに切除し、純水で3回洗浄した。葉片30枚を、PEG600溶液（30%，v/v）30mlの入った三角フラスコにいれ、暗所10℃中で24時間静置した。その後PEG液を純水にかえ、再度、暗所10℃に24時間静置した後、デジタル電導度計（東亜電波工業、CM-30ET）で電気伝導度を測定した（T1）。測定後、オートクレーブ（121℃、15分）で葉組織を破壊し、電気伝導度を測定した（T2）。これとは別に、対照区としてPEG液の代わりに純水中に24時間浸したサンプルを用意し、PEG処理葉片と同様、オートクレーブ処理前後2回電気伝導度を測定した（C1、C2）。以下の式で電解質漏出度を算出した。

$$\text{電解質漏出度（\%）} = (T1/T2 - C1/C2) \times 100$$

#### b. 温度処理

##### b-1) 処理温度を変えた場合の電解質漏出度の測定

上述のように用意した葉片20枚を純水中にいれ、水温を30、35、40及び45℃の4段階とし、暗所で24時間静置した後、電気伝導度を測定した（T1）。測定後、オートクレーブ処理し、再度電気伝導度を測定した（T2）。電解質漏出度は以下の式で算出した。

$$\text{電解質漏出度（\%）} = (T1/T2) \times 100$$

#### b-2) 処理時間を変えた場合の電解質漏出度の測定

aと同様に葉片を用意し、純水の水温を42℃一定として3, 6, 9, 15及び24時間後に電気伝導度を測定した。測定後、オートクレーブ処理し再度電気伝導度を測定し、aと同様に電解質漏出度を算出した。

#### c. クロロホルム処理

aと同様に用意した葉片20枚を30秒間クロロホルムに浸した後、すばやく純水につけ暗所10℃に24時間静置し、電気伝導度を測定した。その後、上述のようにオートクレーブ処理し、電気伝導度を測定し、電解質漏出度を算出した。

#### 4) ケイ酸含量の測定

PEG処理後の電解質漏出度の測定に供試した葉身の一部をサンプリングし、80℃で乾燥させた後、重量法(吉田・岡部, 1975)でケイ酸含量を測定した。

#### 5) カリウム含量の測定

電解質漏出度の測定に供試した葉身の一部を80℃で乾燥させ、120メッシュに粉碎した。粉碎試料約25mgを0.2NHCl 20mlで1時間振とうし、カリウムを抽出した。カリウム含量はテトラフェニルホウ素比濁法(東京大学農学部農芸化学教室, 1960)を用いて測定した。

#### 6) 浸透ポテンシャルの測定

PEG処理実験に供試した葉身の一部を洗浄し、葉片3枚を、直径約0.3cm<sup>2</sup>にパンチし、エッペンドルフチューブに入れ、-80℃下に24時間おいた。その後室温下に30分おき、水ポテンシャルをサーモカップルサイクロメーター(Wescor, C-52)で測定した。

#### 7) 全炭水化物含量及び細胞壁成分多糖類含量の測定(村山ら, 1955; 元村, 1990)

全炭水化物は、5)と同様に用意した粉碎試料約0.1gに0.7NHClを加え、100℃で2.5時間加水分解し抽出した。定量はソモギー・ネルソン法で行

いグルコースで評価した。全炭水化物を測定したサンプルを用いて細胞壁成分多糖類を測定した。粉碎試料0.1gをアルコール可溶性成分と不可溶性成分に分け、不可溶性成分をKOH及びアミログルコシダーゼで処理しデンプンを取り除き、残渣に0.5NHClを加えて100℃、2.5時間加水分解し、多糖類を抽出した。定量はソモギー・ネルソン法で行った。

#### 8) 水ストレス処理

1992年8月31日13時から翌朝5時まで、植物体を各ケイ酸処理培養槽から3個体、水耕液の入った1/5000ワグネールポットに移し、水耕液にマニトールを終濃度0.2M(水ポテンシャル-0.68MPa)になるように加えた。なお、この間の葉身の水ポテンシャルは、対照葉では+S i区、-S i区いずれも平均-0.7MPa、ストレス葉では+S i区-0.98MPa、-S i区-1.13MPaであった。

#### 9) クチクラ伝導度の測定 (Yoshida and de los Reyes, 1976)

植物体を約5時間暗所に置き、気孔を閉じさせた後、暗所で止葉向背両軸のクチクラ伝導度を測定した。測定は、定常型ポロメーター(LICOR, LI-1600)で行った。測定条件は葉温 $25.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $54 \pm 0.4\%$ であった。

#### 10) 葉表面のwax含量の測定

測定は比色法(Ebercon *et al.*, 1977)で行った。葉身を幅約1cmに切断し、クロロホルム10mlに30秒間浸しwaxを溶出させた。クロロホルム溶液をホットプレート上で蒸発させた後、2クロム酸カリウムを加えてwaxと反応させ、波長590nmでの吸光度を測定した。

### 3. 結果

#### 1) 測定法の検討

##### (1) PEG処理

第35図にはPEG濃度を0, 20, 30, 40, 60%の5段階とし24時間処理し

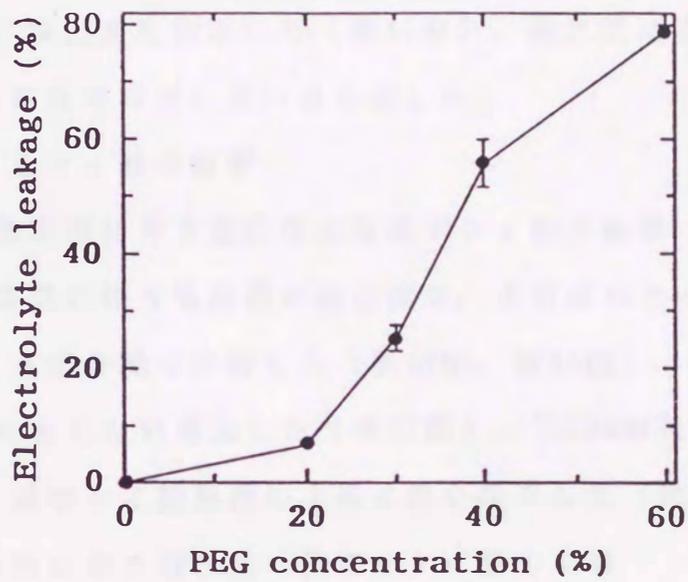


Fig. 35. Relationship between polyethylene glycol (PEG) concentration and electrolyte leakage of rice leaves.

た場合の漏出度を示した。漏出度は、PEG濃度20%(V/V)から濃度の上昇に伴い増加し、PEG60%では、全細胞内電解質の約80%が漏出した。

第36図にはPEG濃度を30%とし、処理時間を0、3、6、9、12、24時間とした場合の漏出度を示した。漏出度は時間が長くなるにつれほぼ直線的に増加した。

#### (2) 葉身の水ストレス及び老化が漏出度に及ぼす影響

主稈着生第4葉(老化葉)及び水ストレスを与えた葉身に30%PEG液24時間処理を行い漏出度を測定した(第15表)。漏出度は老化葉及び水ストレスを受けた葉身で有意に高い値を示した。

### 2) 漏出に対するケイ酸の影響

#### (1) PEG処理濃度に伴う漏出度に及ぼすケイ酸の影響

PEG処理液の濃度に伴う電解質の漏出度を、水耕液のケイ酸濃度を4段階にかえ栽培した葉身間で比較した(第37図、第38図)。漏出度は処理PEG濃度の増加にともない増加した(第37図)。PEG30%及び40%処理による漏出度は、栽培ケイ酸濃度の上昇に伴い低下した(第38図)。

#### (2) 処理時間に伴う漏出度に及ぼすケイ酸の影響

処理PEG濃度を30%、処理温度を42℃一定として、それぞれの処理時間にともなう漏出度を、ケイ酸濃度が0ppm(以下、-Si区)及び100ppm(以下、+Si区)の水耕液で栽培した葉身間で比較した(第39図)。いずれも処理後2.5時間付近から両区に差がみられ、時間の経過に伴い差が大きくなった。温度処理の場合、+Si区の漏出は少なく、処理5時間後と24時間後の値に差はなかった。PEG処理の場合、漏出度は両区とも温度処理の場合より高かったが、+Si区と-Si区の差は約10%で温度処理の場合と同程度であった。

#### (3) 漏出度の季節的变化に及ぼすケイ酸の影響

第40図には、PEG処理で測定した漏出度の季節的变化を示した。老化の影響をなくし、膜安定性に対する環境要因の影響を明確にするため、10

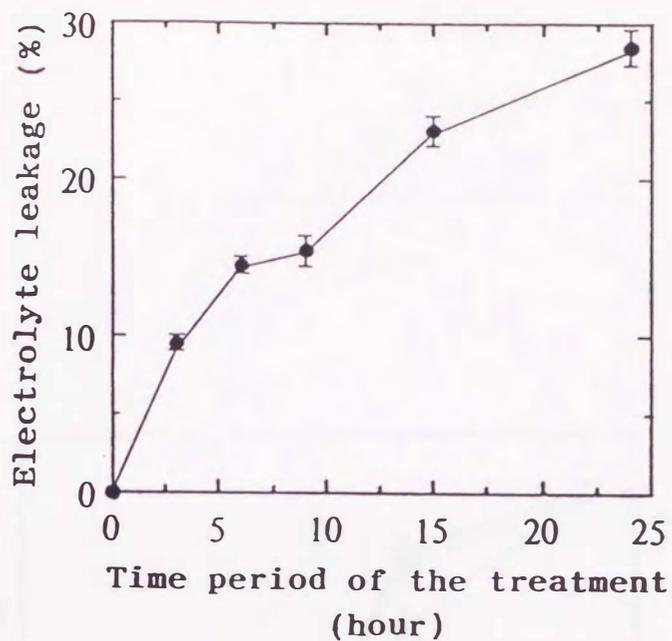


Fig. 36. Relationship between time period of PEG treatment and electrolyte leakage of rice leaves. PEG concentration was 30 %.

Table 15. Effects of senescence and water stress on electrolyte leakage.

Leaf	Electrolyte leakage (%)
control	29.09±2.87 <sup>a</sup>
senescing	33.71±1.78 <sup>a b</sup>
stress	38.38±1.83 <sup>b</sup>

Control, the youngest fully expanded leaf on the main culm; senescing, the fourth leaf from the control leaf; stress, water-stressed the control leaf. Data followed by the same letter in each column are not significantly different by Duncan's multiple range ( $P=0.05$ ).

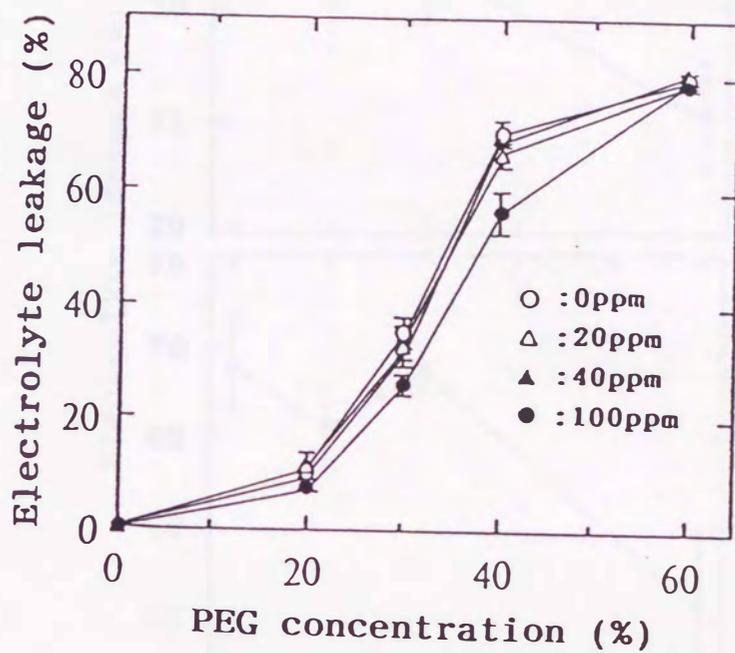


Fig. 37. Effect of SiO<sub>2</sub> on electrolyte leakage as influenced by PEG concentration.

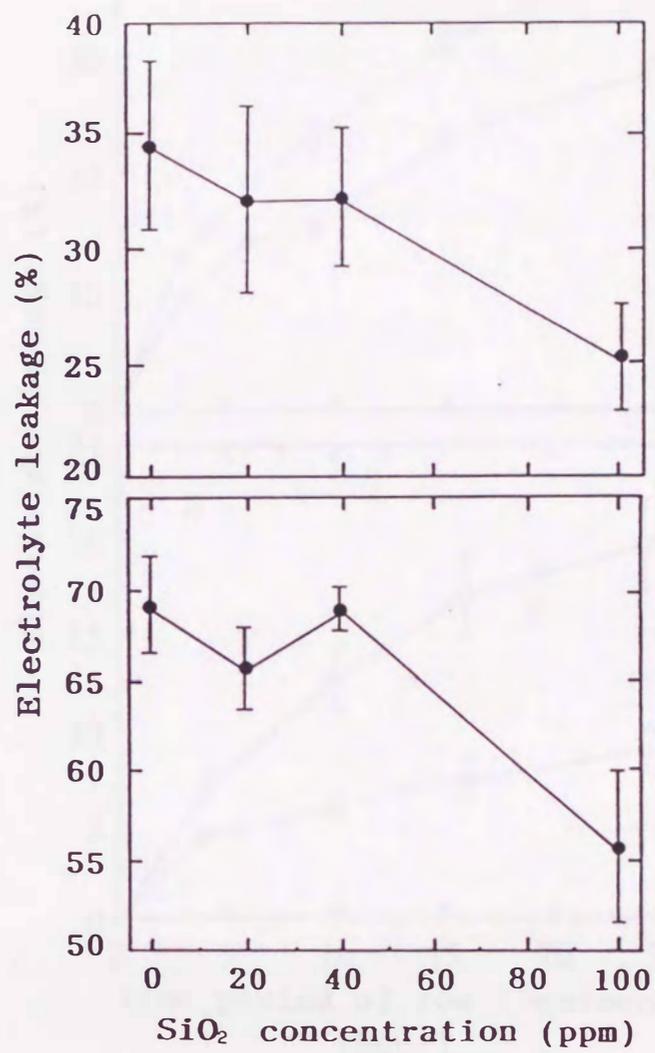


Fig. 38. Effect of SiO<sub>2</sub> on electrolyte leakage treated by 30 % (upper) and 40 % PEG (lower).

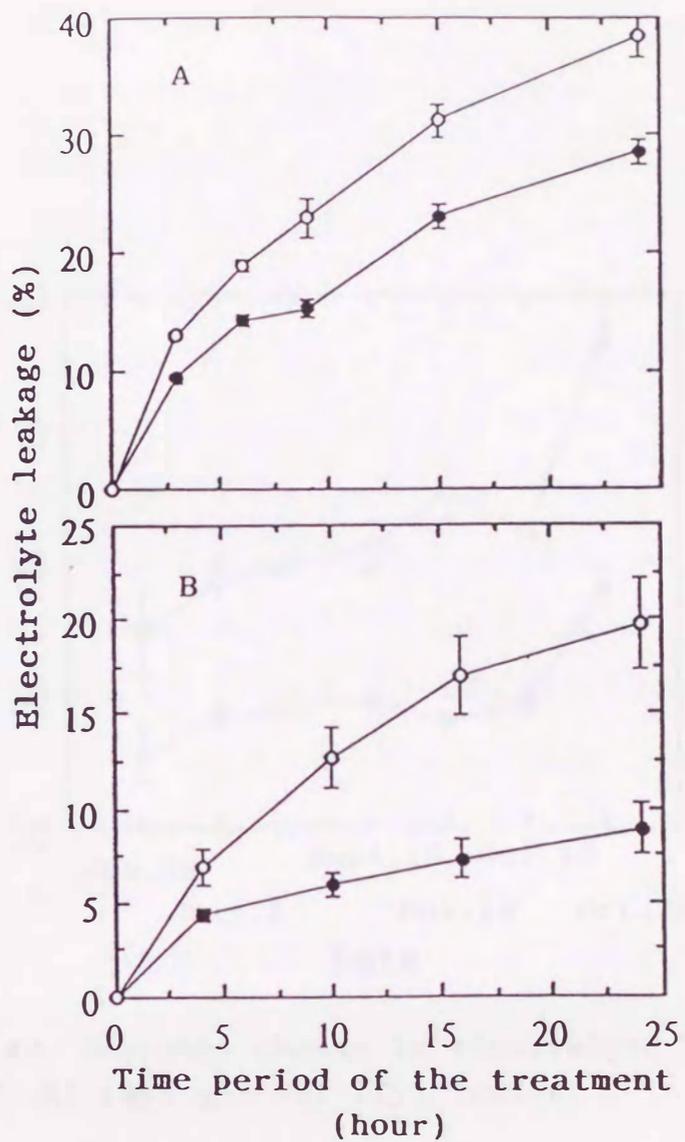


Fig. 39. Electrolyte leakage of +Si (●) and -Si (○) leaves as influenced by time period of the treatment of PEG (A) and heat (B).

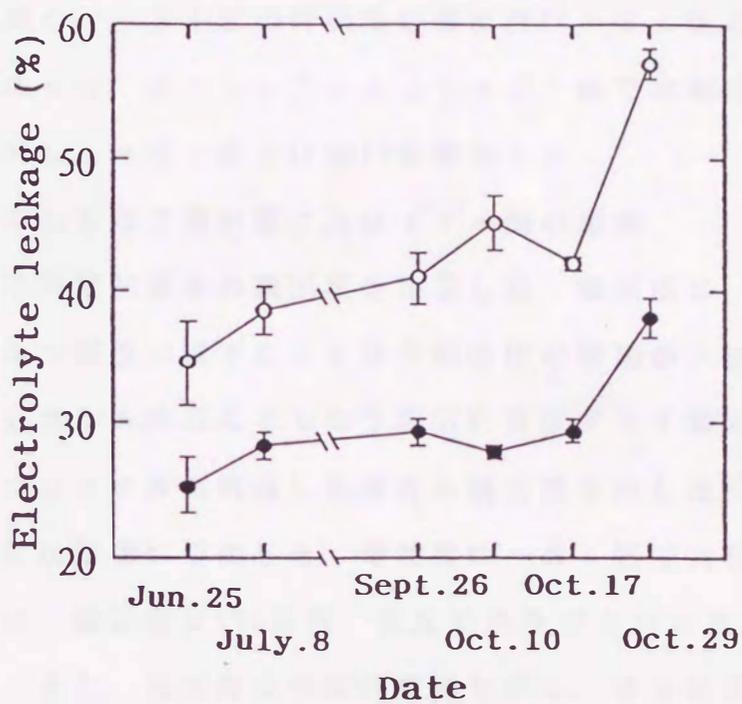


Fig. 40. Seasonal change in electrolyte leakage of +Si (●) and -Si (○) leaves.

月29日の測定以外は播種日をずらして栽培し測定時の葉齢をそろえた。

+S i 区の漏出度は、7月8日から10月17日までほぼ一定であったが、-S i 区の漏出度は、徐々に増加していく傾向にあり、測定全期間にわたって+S i 区より高く推移した。

#### (4) 水ストレス後の漏出度に及ぼすケイ酸の影響

第16表には、水稻個体に水ストレスを与えた葉身の漏出度を比較した。漏出度は水ストレスによって増加したが、対照葉、水ストレス葉いずれも-S i 区で高く、-S i 区の対照葉の漏出度は+S i 区の水ストレス葉と同程度であった。水ストレスによって+S i 区では漏出度が約32%増加したのに対し、-S i 区では約17%増加した。

#### (5) 老化にともなう漏出度に及ぼすケイ酸の影響

第41図に、主稈着生葉身の漏出度を比較した。漏出度は、全葉身-S i 区で高く、かつ葉位の低下にともなう漏出度の増加が大きかった。

#### (6) クロロホルム処理にともなう漏出に及ぼすケイ酸の影響

第17表にはクロロホルム処理した葉片の漏出度を示した。クロロホルム処理で漏出度は顕著に増加した。増加度は-S i 区で大きかった。

以上のように、漏出度はPEG処理、温度処理及びクロロホルム処理によって増加した。また、漏出度は季節的変動を示し、さらに老化の進行にともない増加した。ケイ酸はいずれの場合にも電解質の漏出を抑制し、両区には明確な差異が認められた。

### 3) 漏出を左右する要因に及ぼすケイ酸の影響

次に電解質漏出を左右すると考えられる諸要因に対するケイ酸の影響を検討する。なお、電解質漏出はPEG処理で誘導した。

#### (1) クチクラ伝導度及び葉表面w a x 含量と漏出度との関係に及ぼすケイ酸の影響

まず、葉身の保水能に関連する要因としてクチクラ伝導度及び葉表面w a x 含量を測定し、ついで両者の関係及び漏出度との関係をそれぞれ

Table 16. Effects of water stress on electrolyte leakage of +Si and -Si leaves.

SiO <sub>2</sub> application	control	Water stress
+	29.10±2.87*	38.38±1.83**
-	40.28±3.89	47.24±1.49

\* and \*\*, statistically significant at 5% and 1%, respectively.

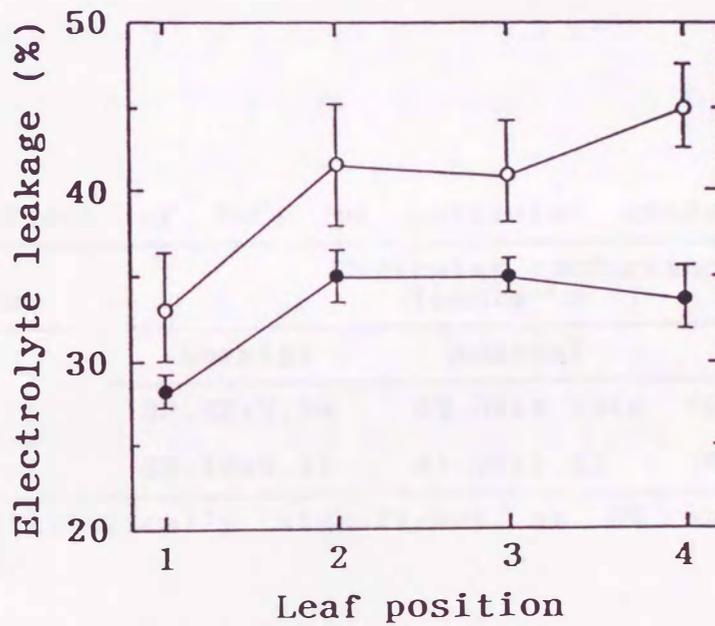


Fig. 41. Electrolyte leakage of each leaf on the main culm in +Si (●) and -Si (○) leaves.

Table 17. Effect of SiO<sub>2</sub> on electrolyte leakage after submerging leaf in chloroform solution.

SiO <sub>2</sub> application	Electrolyte leakage (%)	
	Control	Treatment
+	3.269 ± 0.190	81.76 ± 0.829*
-	3.458 ± 0.164	85.28 ± 0.742

\*, statistically significant at 1%.

Table 18. Effect of SiO<sub>2</sub> on cuticular conductance.

SiO <sub>2</sub> application	Cuticular conductance (μmolm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		
	Abaxial	Adaxial	Total
+	23.62±2.74	23.32±4.23**	46.94±1.66*
-	29.10±4.23	41.29±1.42	70.40±5.69

\* and \*\*, statistically significant at 5% and 1%, respectively.

検討した。第18表には葉身の向背軸について測定したクチクラ伝導度を示した。向背軸両面のクチクラ伝導度を合計した総クチクラ伝導度は - S i 区で約50%高かった。この差は向軸側の差に起因するものであった。

第42図にはクチクラ伝導度と表面 w a x 含量との関係を示した。+ S i 区では、両者に  $Y=81.0-9.1x$  ( $r=0.74^*$ ) で表される有意な負の相関関係が認められた。- S i 区にはそのような関係は認められなかった。

第43図には、クチクラ伝導度と漏出度との関係を検討した。クチクラ伝導度及び電解質の漏出度いずれも - S i 区で顕著に高かった。ケイ酸処理の値を込みにした場合、両パラメーターには  $Y=21.55+0.38x$  ( $r=0.69^{**}$ ) で表される有意な正の相関関係が認められ、クチクラ伝導度が高い葉身ほど漏出度が高い傾向にあった。ケイ酸処理区でみると両パラメーターに有意な関係は認められなかった。

第44図には、葉表面 w a x 含量と漏出度との関係を示した。漏出度は、- S i 区で顕著に高かったが、w a x 含量にはケイ酸処理区で差がなかった。+ S i 区では w a x 含量と漏出度との間に負の相関関係 ( $y=4.73-3.98x$ ;  $r=0.79^*$ ) が認められ、w a x 含量が高い葉身ほど漏出度が低い傾向にあった。

## (2) 浸透ポテンシャル及びカリ含量と漏出度との関係に及ぼすケイ酸の影響

第45図には、浸透ポテンシャルと漏出度との関係を示した。ケイ酸処理区を込みにした場合、両パラメーターに有意な関係は認められなかった。ケイ酸処理区ごとにみると、+ S i 区で両パラメーターに  $Y=40.84-1.45x$  ( $r=0.77^*$ ) の相関関係が認められ、浸透ポテンシャルが低い葉身ほど漏出が小さい傾向にあった。

第46図には、葉身のカリウム含量と漏出度との関係を示した。+ S i 区と - S i 区との間に、 $K_2O$  含量における差異は認められなかったが、漏出度は - S i 区で高い傾向にあった。両パラメーターにはケイ酸処理

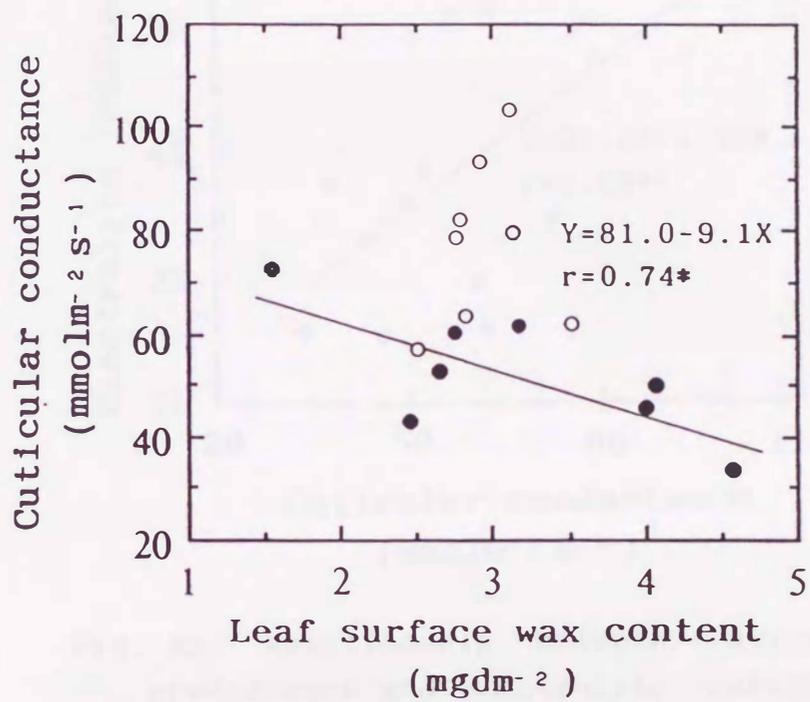


Fig. 42. Relationship between leaf surface wax content and cuticular conductance of +Si (●) and -Si (○) leaves.

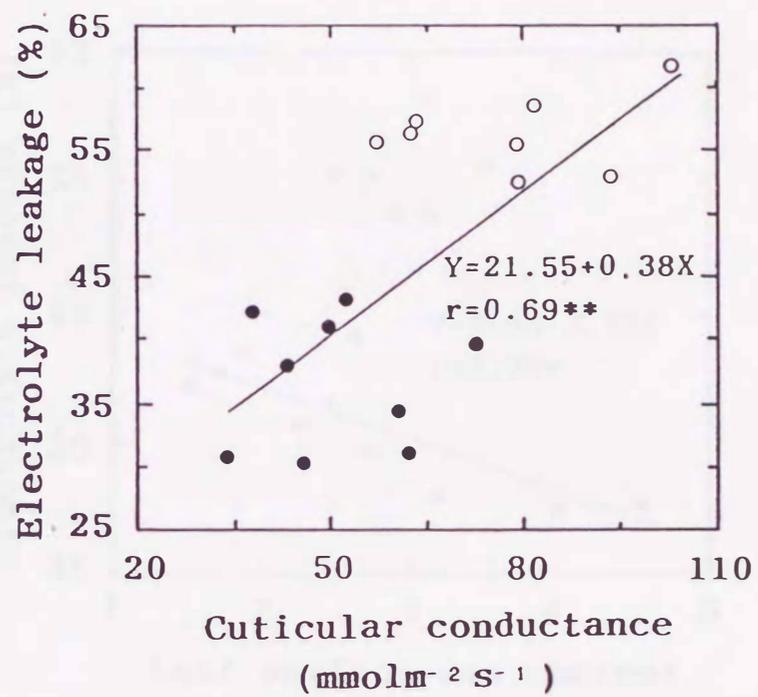


Fig. 43. Relationship between cuticular conductance and electrolyte leakage of +Si (●) and -Si (○) leaves.

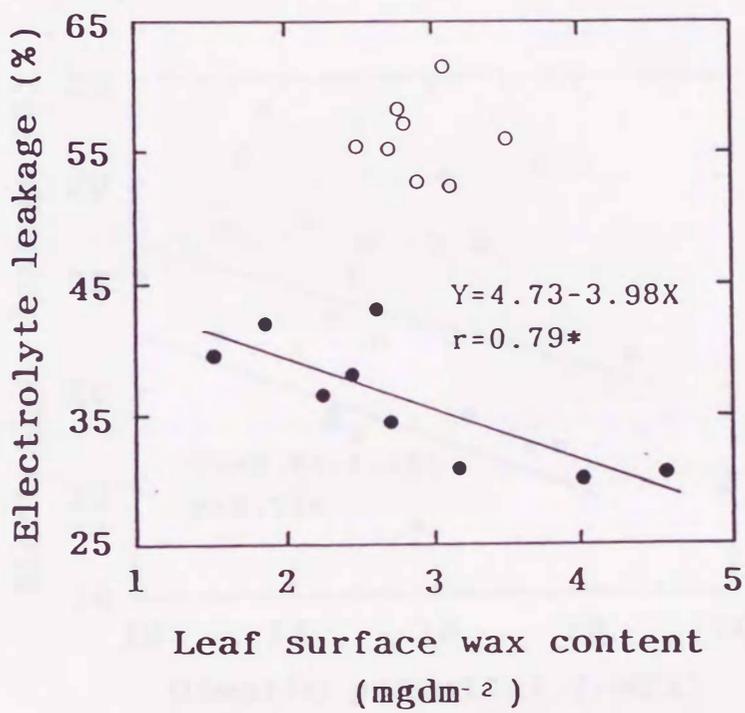


Fig. 44. Relationship between leaf surface wax content and electrolyte leakage of +Si (●) and -Si (○) leaves.

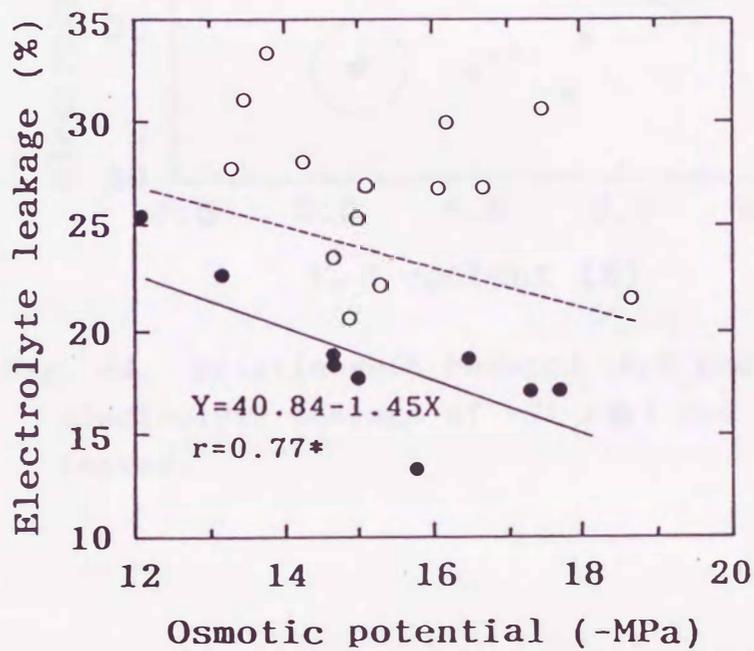


Fig. 45. Relationship between osmotic potential and electrolyte leakage of +Si (●) and -Si (○) leaves.

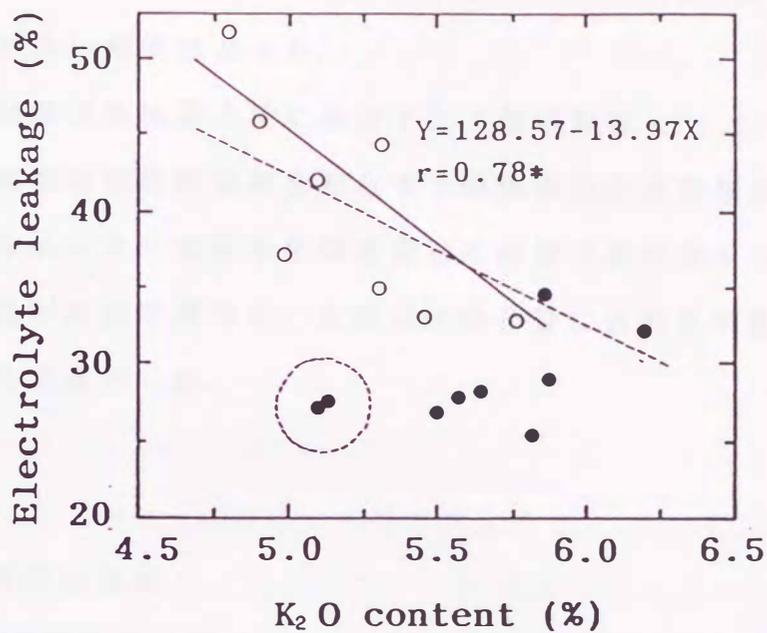


Fig. 46. Relationship between  $K_2O$  content and electrolyte leakage of +Si (●) and -Si (○) leaves.

Table 19. Contents of total carbohydrate(TC) and polysaccharide(PS) in leaves grown under different  $SiO_2$  conditions.

$SiO_2$ application	TC ( $mg \cdot gDW^{-1}$ )	PS ( $mg \cdot gDW^{-1}$ )	%
+	$134.56 \pm 7.00$	$64.66 \pm 1.70^{***}$	$48.27 \pm 1.52^{***}$
-	$135.13 \pm 5.39$	$41.03 \pm 3.47$	$30.49 \pm 2.95$

\*\*\*, statistically significant at 0.1%.

を込みにした場合、 $Y=114.87-14.59x$  ( $r=0.76^{**}$ ) の相関関係が認められた。ケイ酸処理区ごとにみると、-Si区で両パラメーターの間に負の相関関係 ( $y=128.57-13.97x$ ;  $r=0.78^{*}$ ) が認められ、 $K_2O$  含量の高い葉身ほど漏出度が低い傾向にあった。

### (3) 細胞壁成分多糖類含量に及ぼすケイ酸の影響

第19表には細胞の物理的強度を左右する細胞壁成分多糖類含量(以下、細胞壁成分)を示した。全炭水化物含量には両者で差がなかったが、炭水化物の分配比が両者で異なり、全炭水化物含量に占める細胞壁成分の割合が+Si区で高かった。

## 4. 考 察

### 1) 最適測定条件の決定

最適処理PEG濃度及び処理時間は、供試した材料の遺伝的背景を反映した生来の細胞強度及び細胞の環境適応能力を含む生理的特性に左右される。本法は、小麦 (Premachandra and Shimada, 1987a; Premachandra and Shimada, 1988)、オーチャードグラス (Premachandra and Shimada, 1987b)、トウモロコシ (Premachandra *et al.*, 1990) 及びソルガム (Premachandra *et al.*, 1992) 等、飼料作物では広く用いられているが、水稻を用いた報告例はない。そこでまず、処理条件の設定を試みた(第35図、第36図)。測定にはケイ酸を100ppm含む水耕液で栽培した水稻葉身を供試した。漏出度はPEG濃度が20%(V/V)から濃度の上昇に伴い増加し、60%では細胞内電解質の80%が漏出した(第35図)。この結果から、PEG濃度20%では処理強度が充分でなく、60%では過度に強いと判断され、いずれもケイ酸処理区間の差異の検出には不適と考えられた。水稻葉身に対しては、PEG30%あるいは40%が最適濃度と考えられる。

次に、PEG濃度を30%一定とし処理時間を検討したところ(第36図)、漏出度は処理時間が長くなるにつれほぼ直線的に増加し、処理時間は3

時間以上24時間以内であれば任意時間とすることができると判断された。

本法の信憑性を検討するため、植物体の生理的状态の変化に伴う電解質漏出の変動を比較した。ここでは水ストレスを受けた葉身及び老化の進行した葉身について対照葉との比較を行った(第15表)。漏出度は処理強度及び老化状態を反映し増加した。また、得られた値はいずれもばらつきが少なく実験操作上の誤差が少ないと判断された。

これらの結果から、本法は、膜強度の違いを相対的に比較評価でき、水稻葉身における膜損傷度の評価に有効と考えられた(Sullivan, 1971・1972)。

## 2) 膜安定性のケイ酸処理区間での比較

1) の結果をふまえ、PEG溶液で乾燥処理した葉片の漏出度に及ぼすケイ酸の影響を検討した。漏出度は栽培ケイ酸濃度の増加にともなって低下し(第37図、第38図)、ケイ酸が細胞膜安定性の増加に寄与することが明らかとなった。また、+Si区では、生育期間全般にわたって漏出度がほぼ一定に推移したのに対し、-Si区では、若干増加する傾向を示しながら+Si区より高く推移し、10月の測定では+Si葉身の約3倍となった(第40図)。最後の測定を除き、測定は播種日をずらし個体老化の影響を極力なくし行ったので、電解質漏出にみられた差異は季節的な環境変化によって引き起こされたといえる(Blum and Ebercon, 1981; Premachandra and Shimada, 1987b)。気象条件の季節的特徴から判断して、細胞膜の安定性は気温の低下及び日長変化の影響を受け、その影響が-Si区で大きいと考えられた。

主稈着生葉身の漏出度を測定したところ(第41図)、両区には最上位展開葉ですでに差がみられ、葉位が下がり老化が進行するにつれ-Si区の漏出が増加した。一方、+Si区の漏出度は、第2葉以下ほぼ一定であった。葉身の老化が進行すると細胞膜を構成しているリン脂質の相転移及び原形質膜上に局在する酵素タンパク質の活性が低下し、膜の非

特異的な透過性が増加し、細胞内電解質が漏出する (Draper and Simon, 1971; Mckersie *et al.*, 1988; Noodén, 1988; Thompson, 1988)。第2章で明らかにしたように、-Si区では老化の進行が早く、ここにみられた膜安定性の差異は、老化進行を介したものと考えられた。

次に、葉身に水ストレスを与え漏出度を比較した (第16表)。対照葉の水ポテンシャルは、両区とも-0.7MPaと同程度であったが、漏出度は-Si区で高く、-Si区の漏出度は+Si区のストレス葉と同程度であった。水ストレスは、細胞膜脂質を液晶状態からゲル状態に相転移させ、細胞膜脂質二重層中の構造的欠陥及び細胞膜の受動的な物質透過性の増大による細胞内容物の漏出を誘発する (Ferrari-Iliou *et al.*, 1984; Senaratna *et al.*, 1984; Navari-Izzo *et al.*, 1989)。細胞膜中のリン脂質及びステロール濃度が水ストレス下での膜安定性を左右し (Simon, 1974)、リン脂質にステロールが共存すると、リン脂質の流動性及び透過度が低下する (Grunwald, 1974; Mckersie and Thompson, 1979; Ford and Barber, 1983)。したがって、両区の差異は、細胞膜構成脂質及び共存する誘導脂質の組成・濃度、あるいは測定以前のストレス前歴にケイ酸が関与することを示唆している。

前章の結果から、-Si区は水ストレスを受ける頻度が高いと予想され、水ストレス前歴には両区で顕著な差異があると思われる。断続的な軽度の水ストレスは、植物体内に浸透調整に代表されるような適応反応を誘起し (Turner and Jones, 1980)、細胞膜の安定性も増加する (Gupta, 1977; Levitt, 1980; Premachandra and Shimada, 1987a; Zwiazek and Blake, 1990; Premachandra *et al.*, 1992)。-Si区の漏出度は、対照葉で40.3%、ストレス葉で47.2%と17%増加し、+Si区の32%に比較し顕著に低く、膜強化が誘起されているように見受けられた。しかし、これは漏出度が高いレベルでの相対的な強化であり、適応があったとしても+Si区ほどの強度は得られなかったといえる。

以上のように、漏出度には両区で明確な差異が認められ、-Si区は自然環境下にあっても、水ストレスを受けた+Si区と同等の損傷を受けていること、及び水ストレス耐性に関与した細胞膜構成脂質が両区で異なることが示唆された。-Si区は過剰蒸散によって水ストレス状態になりやすいのに加え、ストレス遭遇時の細胞強度も弱いと推定される。このような細胞強度の差異が、第2章で明らかにした葉身の生理的活性低下（老化度）の進行の違いとなって表れ、光合成の低下、ひいては生長・乾物生産の差異を生じさせたと考えられた。

### 3) 漏出を左右する要因に及ぼすケイ酸の影響

#### (1) 葉組織の保水能力

PEG処理は基本的には葉片に浸透ストレスを与える乾燥処理である。漏出度は究極的には細胞膜の強度が支配すると考えられるが、細胞膜強度が同程度の場合には、細胞膜を取り囲む組織の乾燥回避能力（保水能力）が低い葉身で損傷度が大きいと考えられ、細胞膜を取り囲む組織の水分保持能力及び細胞壁及び細胞膜の水分透過度が漏出度を間接的に左右すると考えられる。

組織レベルでみた水分保持能力と膜損傷度との関係を検討するため、両区のクチクラ伝導度を比較した（第18表）。その結果、ケイ酸が葉面向軸側のクチクラ伝導度を抑制することが明らかとなった。これは、従来いわれているケイ酸の葉内移動及び局所的な蓄積によるクチクラ伝導度の抑制効果と一致し、ケイ酸が蒸散流末端部に蓄積し表皮組織のケイ質化及び葉組織内のクチクラ層の発達に寄与しクチクラ伝導度を抑制したと考えられた（Yoshida *et al.*, 1959・1962b; 吉田, 1965）。クチクラ伝導度と漏出度との関係を検討したところ（第43図）、いずれも-Si区で顕著に高かった。両区を込みにした場合、両パラメーターには正の相関関係が認められ、ケイ酸がクチクラ層の発達及び葉組織の保水能を高めることを介して漏出度を抑制したと考えられた。

一般に、水稻のクチクラ伝導度は、葉表面のwax含量に強く左右される (O'toole *et al.*, 1979)。クチクラ伝導度の律速因子である葉表面wax含量を測定し、クチクラ伝導度 (第42図) 及び漏出度 (第44図) との関係を検討した。その結果、+Si区ではいずれのパラメーター間にも高い負の相関関係が認められた。一方、-Si区ではそのような関係は認められず、クチクラ伝導度及び漏出度いずれも+Si区より高かった。クチクラ伝導度に対する葉表面waxの制御は、葉内にケイ酸を含有する場合に正常に機能し、クチクラ伝導度の抑制及び制御には葉内ケイ酸と葉表面wax含量の両方が重要な役割を演じていることが伺われる。

以上の結果から、ケイ酸はクチクラ層及び葉表面wax含量の発達を介してクチクラ伝導度を制御し、葉組織からの水分蒸発量を抑制することで細胞膜の損傷を回避したと考えられた。

## (2) 浸透ポテンシャルと $K_2O$ 含量

ついで、細胞レベルにおける漏出度に及ぼすケイ酸の影響を検討した。上述したように、PEG処理は、葉片を高張液につけ浸透ストレスを与える乾燥処理である。したがって、細胞膜の損傷の受けやすさは葉組織内の溶質と外液 (PEG溶液) との濃度勾配に左右され、葉組織の浸透ポテンシャルが高いほど葉身から外液への水分拡散、すなわち膜の損傷が少ないと考えられる。浸透ポテンシャルと漏出度との間には、正の相関関係が認められ、浸透ポテンシャルが低い葉身ほど漏出度が低いことが明らかとなった (第45図)。

浸透ポテンシャルは溶質中の無機イオン、炭水化物及び有機酸等の浸透物質の濃度によって決定されるが、なかでもカリウムの寄与度が大きい (Jones *et al.*, 1980; Itoh and Kumura, 1987)。また、漏出度を算出する際のパラメーターである電気伝導度は主として $K^+$ イオンであることから (Premachandra, *et al.*, 1989)、カリウム含量を浸透ポテン

シャルの主要構成成分とみなし漏出度との関係を検討した（第46図）。

ケイ酸処理区を込みにした場合、 $K_2O$ と漏出度は負の相関関係にあり、 $K_2O$ 含量が高い葉身ほど漏出度が低いことが明らかとなった。しかし、 $K_2O$ 含量あたりでは、 $-Si$ 区の漏出度が顕著に高かったことから、浸透ポテンシャルの大小は漏出に関与はしているが、漏出度を左右する主要因ではないと考えられる。

浸透ポテンシャルは環境条件、特に水分状態によって大きく変動する。植物が軽度の水ストレスを長期間うけると、浸透調整が起きカリウムが蓄積する（Turner and Jones, 1980; Itoh and Kumura, 1987）。同様に、膜脂質の構成成分組成が変化し、乾燥に対する膜安定性が増加する（Gupta, 1977; Levitt, 1980; Premachandra and Shimada, 1987a; Zwiazek and Blake, 1990; Premachandra *et al.*, 1991; Premachandra *et al.*, 1992）。したがって、 $-Si$ 区における $K_2O$ 含量と漏出度との間にみられた負の相関関係は、いずれも水ストレスによって引き起こされた生理作用の結果を表していると考えられ、浸透ポテンシャルは、漏出を左右する主要因ではないと判断される。

### （3）細胞膜および細胞壁

PEG溶液処理による膜損傷の受けやすさは、細胞内の保水能力、すなわち、細胞壁及び細胞膜の溶液透過性に左右されると考えられる。脂質を溶かす溶媒であるクロロホルムを細胞内に浸透させ漏出する電解質量を測定することで、細胞壁及び細胞膜を含むアポプラスト領域の溶液透過度を評価した（第17表）。クロロホルム処理によって葉内電解質の大部分が漏出し、クロロホルムが葉内に浸透し細胞膜が溶解したと推定された。漏出度には両区で有意な差がみられ、 $-Si$ 区で顕著に高く、溶液透過度が高いことが示唆された。ケイ酸は、葉身内でアポプラスト領域に多量に沈積する（Sangster and Parry, 1981）。走査型電子顕微鏡による形態観察では、 $+Si$ 区の表皮組織及びアポプラスト領域の肥厚化

が確認された（第15図，第16図，第32図及び第33図）。したがって，両区の差異は，1）ケイ酸の蓄積によるアポプラスト領域の溶液透過性の低下，及び2）細胞壁成分の増加を介した細胞壁の肥厚化，あるいは3）膜脂質の不可溶化に起因すると考えられる。

細胞壁成分多糖類（以下，細胞壁成分）を測定したところ（第19表），全炭水化物に占める細胞壁成分含量の割合が+S i区で顕著に高く，炭水化物の壁成分への分配あるいは合成にケイ酸が関与していることが示唆された。また，生長に関連する生理的諸反応の基質である全糖の量は両者で差がなく，-S i区では，壁成分の不足分をデンプンの形で蓄積していた（データは示さず）。このことは，糖代謝に対するケイ酸の関与を示唆するもので興味深い。

ケイ酸は細胞壁構成成分の架橋組織として機能しリグニンの合成・蓄積に作用し細胞壁の肥大化を促進する（Schwarz, 1973; Parry and Kelso, 1975; Raven, 1983）。また，水稻の培養細胞を用いた実験では，ケイ酸が細胞壁の肥大を介して培養細胞の生長量増大に寄与することが明らかとなっている（石丸, 1992）。ケイ酸はこのような細胞壁の合成及び自身の壁への蓄積を介して細胞の強度を増大し（Schwarz, 1973; Parry and Kelso, 1975; Raven, 1983; Takeoka *et al.*, 1983），ストレスに対する耐性を向上させると推察される。

以上は，PEGテストによる結果を基に解析したものである。上述したように，本法による漏出度の差異は，葉身の保水能を介した可能性も大きく，膜本来の強度の比較には，乾燥の影響のない漏出度を比較する必要がある。

高温水に葉身を浸し漏出度を比較する方法は，細胞膜の熱安定性とよばれ（Sullivan, 1971・1972），細胞膜の耐熱性を推定する方法として広く用いられる（Martineau *et al.*, 1979; Peck and Wallner, 1982; Wallner *et al.*, 1982; Shanahan *et al.*, 1990）。本法は，水分状態

が十分な条件下で膜に損傷を与えるため、細胞の耐乾燥性の大小に影響されない膜本来の強度を比較する有効な手段であると考えられる。漏出度は、-Si区で顕著に高く推移し、熱処理の時間にもとない増加した。一方、+Si区ではほとんど一定で推移した（第39図）。細胞膜はリン脂質、糖脂質、ステロールなどそれぞれ固有の融点をもついくつかの脂質から構成されるため、脂質組成の違いが細胞膜脂質の流動性を介して細胞膜の熱安定性を左右する。細胞膜中の不飽和化した脂質の含量が高温における脂質二重層の構造及び機能の維持に大きく貢献する（Pearcy, 1978; 笠毛, 1991）。ケイ酸処理区の膜の熱安定性の差異は、ケイ酸が上述した耐旱性向上に関与した諸特性を向上させるのに加え、膜脂質の含量及び組成にも関与していることを示唆する。近年、ケイ藻では、ケイ酸が膜脂質の合成に関与していることが明らかとなっている（Taguchi *et al.*, 1987）。今後、膜脂質を構成する脂肪酸の組成比及び脂質合成関連酵素の活性を考慮にいれたさらなる研究の進展が望まれる。

以上のように、ケイ酸が細胞膜・壁の合成強化、組織レベルでの水分保持能力の向上、細胞の保水能力の向上等に関与し細胞膜の安定性を向上させることが明らかとなった。膜安定性の向上は環境ストレス耐性の向上及び葉身の生理的機能の維持に寄与し、葉身の老化抑制に貢献すると考えられた。

## 5. 摘要

ケイ酸による乾物生産向上効果の主要因である葉身の生理的活性維持（老化抑制）に関連して、ケイ酸の環境ストレス耐性向上効果を明らかにすることを目的に、細胞膜の安定性及びその関連要因について検討した。得られた結果は以下のように要約される。

1) PEGテストの測定条件を検討したところ、処理PEG濃度は30%あるいは40%が最適であることが明らかとなった。また、処理時間は24時間以

内であれば、実験の便宜上任意時間とすることができた（第35図、第36図）。

2) 漏出度は、葉身の生理的状态を反映し（第15表）、実験上の誤差も少なかったことから、本法は水稻葉身の膜安定性を評価するのに有効であると判断された。

3) ケイ酸が膜安定性を向上させることが明らかとなった（第37図、第38図）。漏出度には環境変化及び老化の影響が認められ（第40図、第41図）、-Si区個体では生育期間を通じ、個体レベルで細胞膜の安定性が低いことが明らかとなった。

4) クチクラ伝導度と漏出度との間には正の相関関係がみられ（第43図）+Si区ではクチクラ伝導度を左右する葉表面wax含量と漏出度との間に負の相関関係が認められた（第44図）。このことから、ケイ酸が葉表面wax含量の増加及びクチクラ層の発達を介してクチクラ伝導度を抑制し、保水能を高め、漏出を抑制していることが明らかとなった。

5) -Si区では、 $K_2O$ 含量と漏出度との間に負の相関関係が認められ、 $K_2O$ 含量が高い葉身ほど漏出度が小さい傾向にあることが明らかとなった（第46図）。

6) 脂質を溶解する溶媒であるクロロホルム液による損傷度が、-Si区で有意に高く、葉組織内の溶液透過度が-Si区で大きいことが明らかとなった（第17表）。

7) 全炭水化物に占める細胞壁成分含量の割合が+Si区で高く、ケイ酸が細胞壁成分の合成に関与していることが示唆された（第19表）。ケイ酸は葉内に蓄積することによって液透過度を抑制するのに加え、細胞壁成分の合成にも関与して膜の安定性に寄与している可能性が示唆された。

8) 細胞膜の熱安定性が、+Si区で顕著に高く、ケイ酸は保水能の向上のみならず、膜脂質組成にも関与し、細胞膜安定性を高めていること

が明らかとなった（第39図）。

9) 以上のことから、ケイ酸は細胞壁の合成あるいは細胞膜の構成成分組成の関与を介して細胞膜の安定性を向上し、物理的な環境ストレスに対する耐性を向上させていることが明らかとなった。

## 第5章 葉身の生理的活性の維持に 対するケイ酸の影響

### 1. はじめに

ケイ酸の効果は、現象的には葉身直立化による受光態勢改善（岩田・馬場, 1961; Yoshida *et al.*, 1969), 耐窒素（アンモニア）性（高橋, 1987), 耐病性（秋本, 1939; 石塚・早川, 1951; Jones and Handreck, 1967), 耐倒伏性の向上（志茂山, 1958; 橋本, 1959; 小幡, 1959）及び根の酸化力促進（奥田・高橋, 1962b）等であり、その効果発現の基礎は、受光態勢改善を介した個体光合成速度の増加にあるとされる。現在、広く認められるケイ酸の効果は、ケイ酸を多量に蓄積した後に現れる組織の物理的な強化作用を論じたものがほとんどである。

乾物生産は種々の環境変動に対応した光合成効率及びその能力維持に左右される。本研究はこのような基本概念に沿い、物理的作用以外の生理的な作用に対するケイ酸の影響を検討していくつか新たな知見を得た。ケイ酸は、環境要因に対する環境シグナルに対する気孔開閉機能の調節、クチクラ伝導度の抑制及び細胞膜安定性の向上を介して水ストレスの回避あるいはストレス耐性を向上させ、葉身の光合成能を維持し、個体全体のCO<sub>2</sub>固定量の上昇、ひいては乾物生産の増大を実現したと考えられた。これらの効果は上述した受光態勢の影響のない場合にも観察され、ケイ酸が物理的強化作用以外の直接的な生理作用を有することは明確であると考えられた。特に第3章で明らかにした気孔の青色光効果に及ぼすケイ酸の影響あるいは第4章で検討した細胞壁の合成・分配及び細胞膜脂質組成に対するケイ酸の関与は、ケイ酸が代謝生理的機能を有すると仮定しなければ説明し難い現象であった。

しかしながら、これらは、施用後約30日から約60日栽培した植物体を供試したいわば長期的な施用効果であるため、得られた値には実験開始

以前に蓄積した同化産物及び重合ケイ酸の二次的な作用が含まれる。ケイ酸の直接的な生理作用について確証を得るためには、可溶性ケイ酸の付与に付随し短期間に発現する水稻体内の生理的機能の変動を、ケイ酸の体内重合度とのかねあいから検討する必要があると考えられる。

前述したように、本研究では、下位葉の生理的活性維持を乾物生産に対するケイ酸施用効果の主因であるとみなした。しかし、ケイ酸欠如葉身では、通常的环境条件下においても軽度のストレスを受けている可能性があり、ケイ酸施用による老化抑制効果は、重合蓄積したケイ酸によるストレス耐性向上を介したものとも考えられる。したがって、老化に対するより直接的なケイ酸の生理作用を明らかにするためには、環境ストレスの少ない状態で、人為的に誘導した老化の進行過程を器官相互の関連性及びケイ酸の作用部位（器官）・作用形態を考慮した形で検討する必要がある。

以上のことを背景に、本章では、ケイ酸処理を施した個体・葉身を高湿度条件に保った暗所に静置して人為的に老化を誘導し、個体及び切除葉身の老化の進行過程を経時（日）的に測定し、可溶性ケイ酸が老化進行の抑制に及ぼす影響及びその作用部位を明確にした。

## 2. 材料と方法

### 第1実験 個体老化誘導実験

#### 1) 供試材料と栽培条件

コシヒカリを供試した。播種は1993年4月16日、栽培法及び栽培条件は第2章2と同様である。ケイ酸処理後33日目から38日目、第11葉が完全展開した直後の第2葉身及び第4葉身を測定に供試した。

#### 2) ケイ酸処理

ケイ酸処理は、栽培時と老化誘導直前の計2回行った。ケイ酸処理にはいずれも水ガラス（ケイ酸ナトリウム）を用い、100ppm（+Si）区

及び0ppm (-Si) 区の2処理区とした。老化誘導直前の処理では、約5cmの水を張った水槽の上に+Si及び-Si液を満たした1/5000ワグナーポットをおき、その上に植物体を固定しケイ酸処理を行った。処理区はケイ酸を与えて栽培した植物体に-Si水耕液を吸わせる+-区、その逆である-+区の2区を設けた。ケイ酸の葉内への重合の抑制及び-Si区で懸念される水ストレス回避のため水槽全体をビニール幕で覆い高湿度条件に保った。

### 3) 老化の誘導

暗黒下、気温30℃、湿度90%以上の条件に保った恒温器中に+Si液及び-Si液をいれたポットをおき、その上に植物体を固定し老化を誘導した。

### 4) 光合成速度及びクロロフィル含量の測定

光合成速度の測定は液相型酸素電極法で行った。葉身の中央部から先端部にかけて葉身を3等分した最先端部位の基部を、0.30cm<sup>2</sup>のパンチで3枚切除しカッターでさらに8分割した。細断葉片を脱気した後、緩衝液の入った反応層(容量3ml)内に入れスターラーで攪半しながら酸素放出速度を自動記録した。酸素放出量はクラーク型酸素電極(Rank brother)で測定した。緩衝液は0.5M硫酸カルシウムを含む50mM HEPES-KOH (pH7.2)を用い、基質として炭酸水素ナトリウム(終濃度33mM)を加え反応を開始させた。測定時の光強度は2000 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上の飽和光強度、液温は30.0 $\pm$ 0.1℃に設定した。

光合成速度測定後、測定葉片を直ちに回収し99%エタノール10mlに入れ、24時間クロロフィルを溶出させ、波長649、665nmにおける吸光度を測定した(Wintermans, 1965)。

### 5) ケイ酸体 (Takeoka et al., 1983) 及びケイ酸含量の定量 (吉田・岡部, 1975)

酸素放出速度を測定した葉身の一部をホルマリン：アルコール：酢酸

混合液（5：90：5）で固定し水洗後アイロンで圧縮乾燥した。この標本を黒色ビニールに密閉したFGフィルムにのせ10keV、5mAの軟X線を30秒照射した。得られた像を焼付けしケイ酸体画像を得た。ネガフィルムに写った葉身から任意の部位を2～3ヶ所選びケイ酸体数をNiconビノキュラー（x40）で観察・定量した。ケイ酸含量は重量法で定量した（吉田・岡部，1975）。

## 第2 実験 葉身老化誘導実験

### 1) 供試材料と栽培条件

コシヒカリを供試した。播種は1993年7月13日、栽培法及び栽培条件は第2章2と同様である。出穂後2日から10日経過した主穂及び第一次分けつ着生の止葉を測定に供試した。

### 2) ケイ酸処理

ケイ酸処理は、栽培時及び老化誘導時の計2回行った。ケイ酸処理にはいずれも水ガラス（ケイ酸ナトリウム）を用い、栽培時には100ppm（+Si）区及び0ppm（-Si）区の2処理区、老化誘導時には、0、50、100、200ppmの4処理区とした。栽培時はケイ酸処理を経根的に行い、老化誘導時には任意濃度のケイ酸を添加した水耕液30ml上に葉片を浮かべ、葉片背軸側に直接吸収させた。なお、事前にイオン交換樹脂（アンバーライトIR120B）に通した処理液で同様の実験を行い、水ガラス中のNaの影響がないことを確認した。

### 3) 老化の誘導

止葉を0.3cm<sup>2</sup>のパンチで打ち抜き、上述の溶液に葉片を15枚から20枚浮かべ、室温30℃、暗黒条件下に静置した。

### 4) 光合成速度及びクロロフィル含量の測定

各処理液に浮かべた葉片を3枚1～7日間経時的にサンプリングし光合成速度（酸素放出速度）及びクロロフィル含量の測定に供試した。測

定法はいずれも第1実験と同様である。

### 3. 結果

#### 第1実験 個体老化誘導実験

暗黒条件で温度及び湿度を一定に制御した恒温器中に個体をポットごと静置し、老化の進行度に及ぼすケイ酸の影響を検討した。第47図には、暗処理した個体の上位葉及び下位葉における光合成速度の経日的変化を示した。光合成速度は、暗処理が長くなるにつれ低下した。暗処理以前にケイ酸処理をしていない - Si 区では、光合成速度が上位葉、下位葉いずれも3日目にほとんど停止した。この傾向は、同様な個体を用い老化誘導時にケイ酸を与えた場合でも同様であった。一方、暗処理以前にケイ酸を与え栽培した + Si 区の上位葉では3日目でも光合成速度が維持され、5日目に停止した。下位葉身では、+ Si 区で光合成速度が3日目まで維持され、4日目に停止した。

第48図は光合成速度を測定した葉身のクロロフィル含量を示した。上位葉のクロロフィル含量は、- Si 区では3日目でほとんど分解されたのに対し、+ Si 区では4日目で最大値の約50%を保持した。下位葉ではクロロフィル含量が上位葉より直線的に低下したが維持度は+ Si 区で高く、3日目で最大値の約50%が保持された。

第49図は暗呼吸速度の経日的変化を示した。暗呼吸速度は暗処理が長くなるにつれ低下した。測定期間中、上位葉、下位葉いずれにもケイ酸処理による差異は認められずほぼ同一な値を示した。

このように、個体老化に対するケイ酸の効果は明確であり、暗所処理3日目で顕著な差異が認められること、また、ケイ酸を老化の誘導時に与えた場合には効果がないことが明らかとなった。

短期間のケイ酸処理後が個体老化に及ぼす影響を検討するため、ケイ酸を含まない培養液で栽培した個体(- Si 区個体)にケイ酸を与える

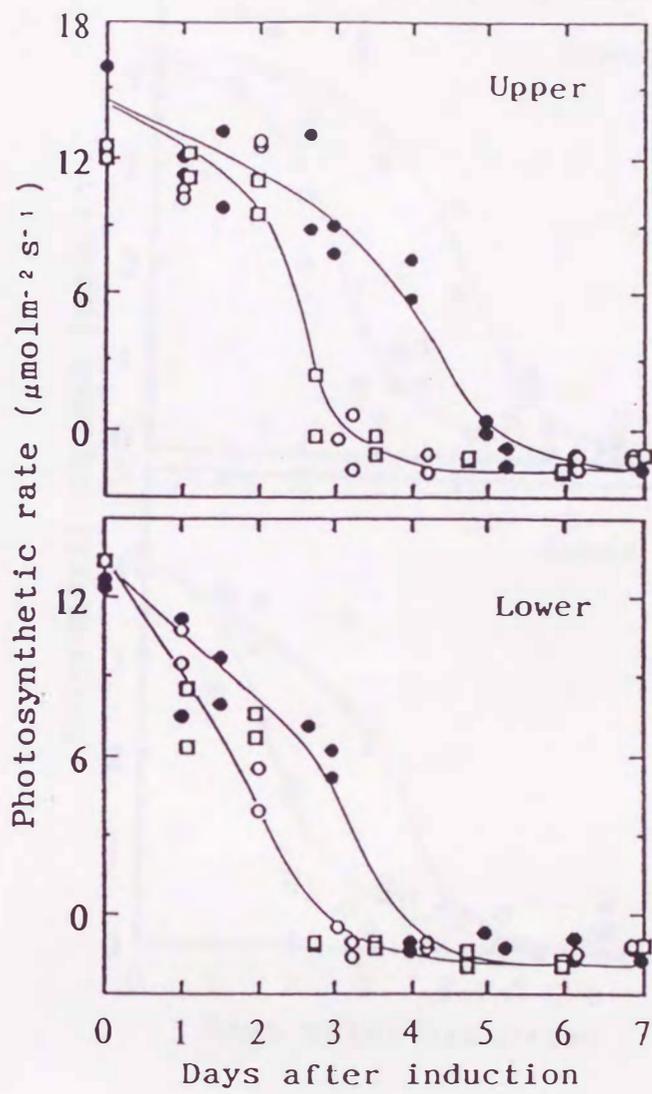


Fig. 47. Change in photosynthetic rate of upper and lower leaves of +Si (●) and -Si (○, ◐) plants after senescence induction treatment. ◑, -Si plant applied  $\text{SiO}_2$  during senescence induction.

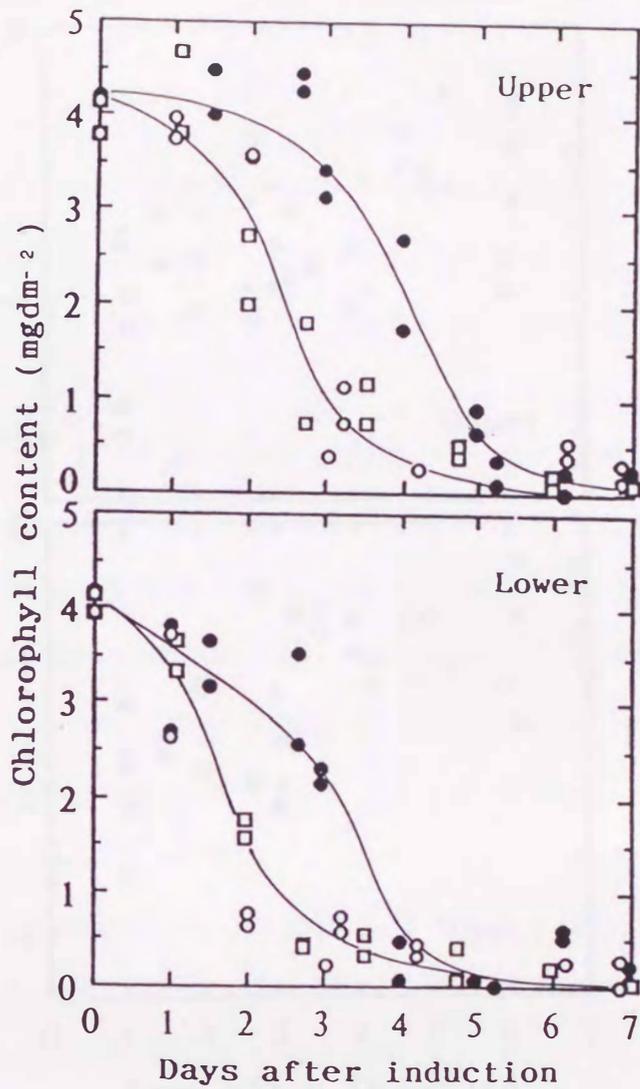


Fig. 48. Change in chlorophyll content of upper and lower leaves of +Si (●) and -Si (○, □) plants after senescence induction treatment. □, -Si plant applied SiO<sub>2</sub> during senescence induction.

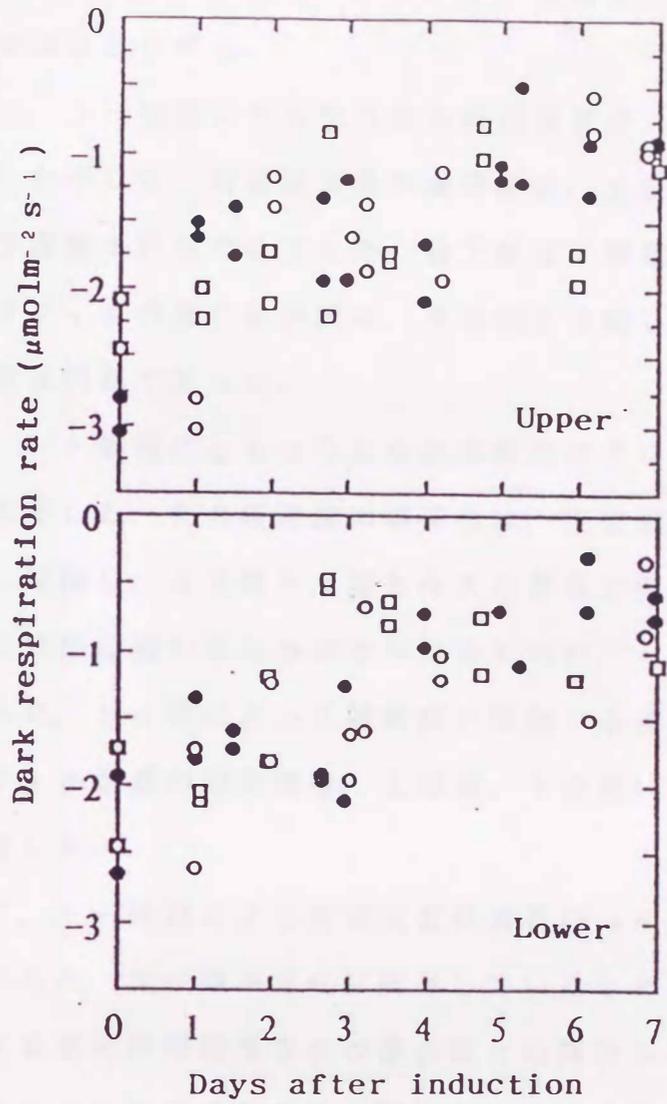


Fig. 49. Change in dark respiration rate of upper and lower leaves of +Si (●) and -Si (○, □) plants after senescence induction treatment. □, -Si plant applied SiO<sub>2</sub> during senescence induction.

処理（以下， $-+$ ），及びケイ酸を含む培養液で栽培した個体（ $+Si$  区個体）にケイ酸を与えない処理（以下， $+-$ ）を1～4日間行った後，3日間暗処理を施し光合成速度及びクロロフィル含量を測定した．なお，暗処理3日後の光合成速度及びクロロフィル含量をここでは簡略化し単に維持度と呼ぶことにする．

第50図には， $+-$ 処理にともなう光合成速度及びクロロフィル含量の維持度の変化を示した．光合成速度の維持度は，上位葉，下位葉いずれも $+-$ 処理処理後3日目で低下した．低下度は下位葉で大きい傾向にあった．クロロフィル含量の維持度は，光合成と比較して低下度は小さいが，低下傾向は同様であった．

第51図は， $-+$ 処理にともなう光合成速度及びクロロフィル含量の維持度の変化を示した．光合成速度の維持度は，上位葉では $-+$ 処理後1日目で急激に増加し，4日間ケイ酸を与えた個体と同程度になった．下位葉では，3日後に値の落込みがみられるものの， $-+$ 処理による増加傾向は認められ，ケイ酸によって維持度が増加することが明らかとなった．クロロフィル含量の維持度は，上位葉，下位葉いずれも光合成速度と同様に推移した．

このように， $+-$ 処理による老化促進効果及び $-+$ 処理による老化抑制効果が認められ，ケイ酸が老化に関与していることが明らかとなった．

ケイ酸による老化抑制効果をその重合度との関連から検討するため，ケイ酸の重合により形成されるケイ酸体を， $+-$ 処理及び $-+$ 処理それぞれについて検討した（第52図）． $+-$ 処理では，通常黒点として観察されるケイ酸体が葉脈に沿って著しく重合し，黒線として観察された． $+-$ 処理にともなうケイ酸体の重合度に変化はみられず，いずれも黒線として観察された．一方， $-+$ 処理の場合，ケイ酸体は処理後日数が経過しても全く形成されなかった．

第53図にケイ酸体数とケイ酸含量との関係を示した．両者の間には $Y=$

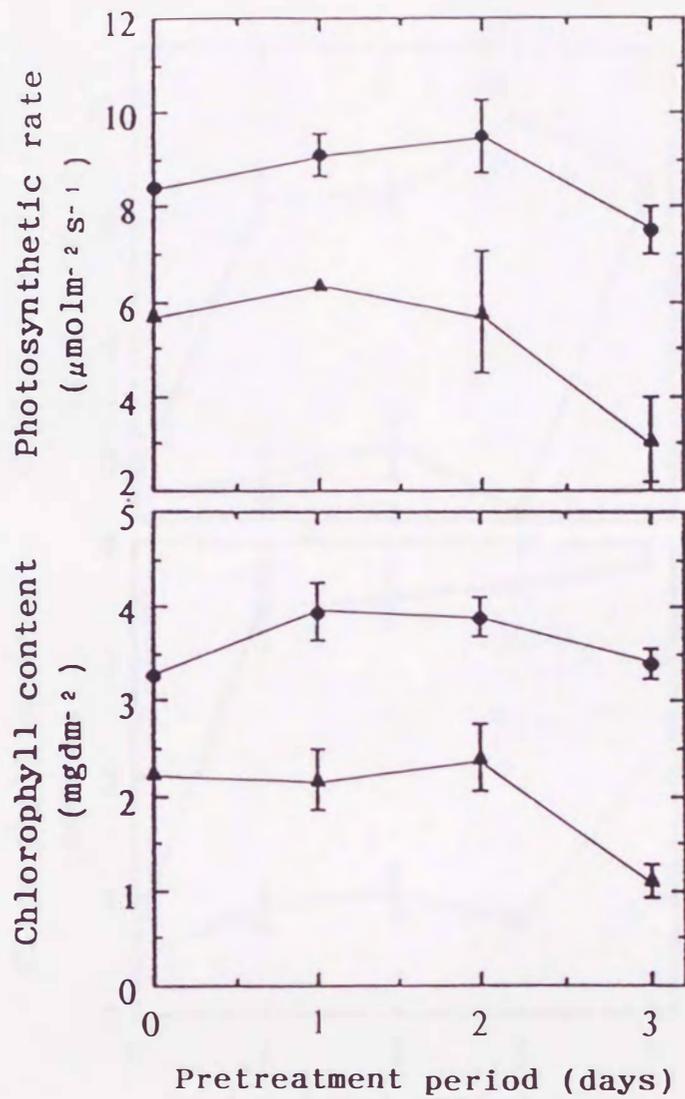


Fig. 50. Effect of pretreatment period of  $\text{SiO}_2$  on the retention degree of photosynthetic rate and chlorophyll content of +Si leaves. ●, upper leaf; ▲, lower leaf.

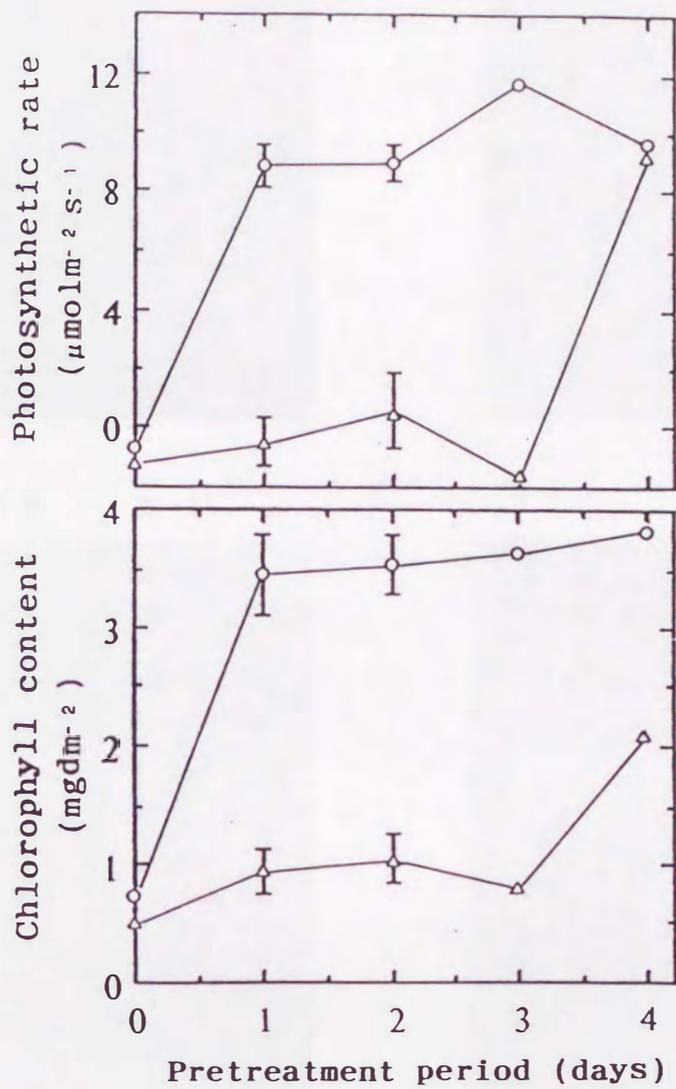
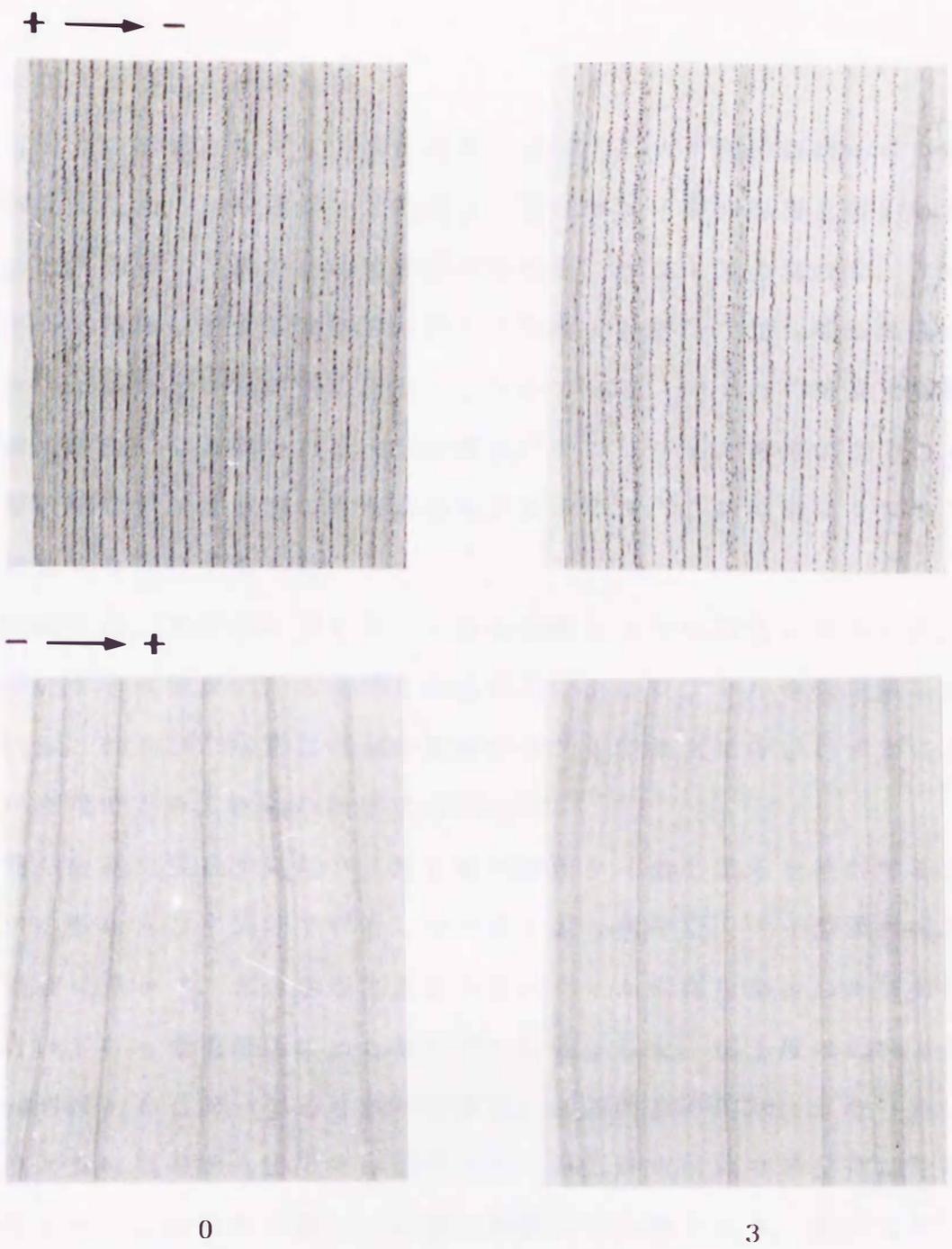


Fig. 51. Effect of pretreatment period of SiO<sub>2</sub> on the retention degree of photosynthetic rate and chlorophyll content of -Si leaves. ○, upper leaf; △, lower leaf.



0 3

Days after transplanting

Fig. 52. Silica bodies of leaves transplanted from +Si to -Si (upper) and -Si to +Si (lower) water culture solution. x11.6.

$0.041+0.000019X$  ( $r=0.86^{***}$ ) の高い正の相関関係が認められた。

## 第2実験 葉身老化誘導実験

器官相互の影響をなくし、葉身の老化に対するケイ酸の直接的な影響を検討するため、切除葉身の老化進行に及ぼすケイ酸の影響を検討した。第54図は、外与ケイ酸の影響を検討するため、-Si区の葉片を、ケイ酸濃度が4段階に異なる水耕液に浮かべ暗所に静置し、光合成速度及びクロロフィル含量を経時的に測定したものである。いずれの葉身でも暗処理時間が長くなるにつれ光合成速度及びクロロフィル含量は低下した。低下度に処理ケイ酸濃度の影響はみられなかった。この傾向はクロロフィル含量でも同様であった。

第55図には、老化度に対するケイ酸の影響をより明確化にするため、溶液中のケイ酸濃度に対する光合成速度及びクロロフィル含量を示した。いずれも、55及び78時間目の値が溶液中のケイ酸濃度に伴いわずかに上昇した程度であり、明確な効果はなかった。

葉身の老化に及ぼす外与ケイ酸と葉内蓄積ケイ酸の関与を検討するため、ケイ酸を含む水耕液で栽培した+Si区の葉片を、ケイ酸濃度の異なる溶液に浮かべ、光合成速度及びクロロフィル含量を測定した(第56図)。いずれも暗期処理にともない徐々に低下した。低下度は0ppm及び100ppm液ほとんど同一であり約70時間後には初期値の約20%となった。

このように葉身老化実験では個体老化にみられた明確な老化抑制効果が消失した。この傾向は葉内ケイ酸の蓄積度に影響されず、根系にケイ酸を供給した場合にケイ酸の老化抑制効果が認められることが明らかとなった。

## 4. 考察

光合成速度及びクロロフィル含量は老化の指標として広く用いられる

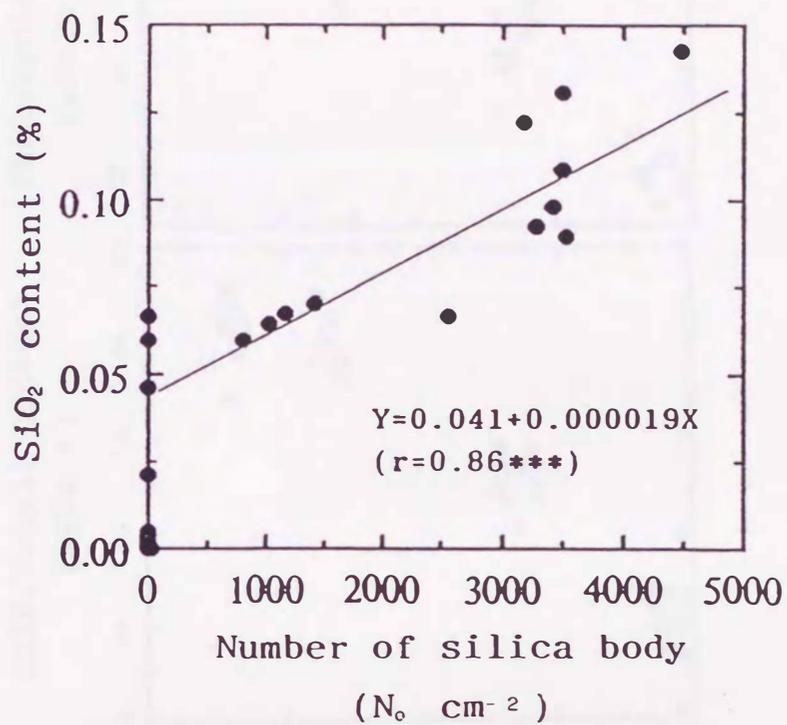


Fig. 53. Relationship between number of silica bodies and SiO<sub>2</sub> content.

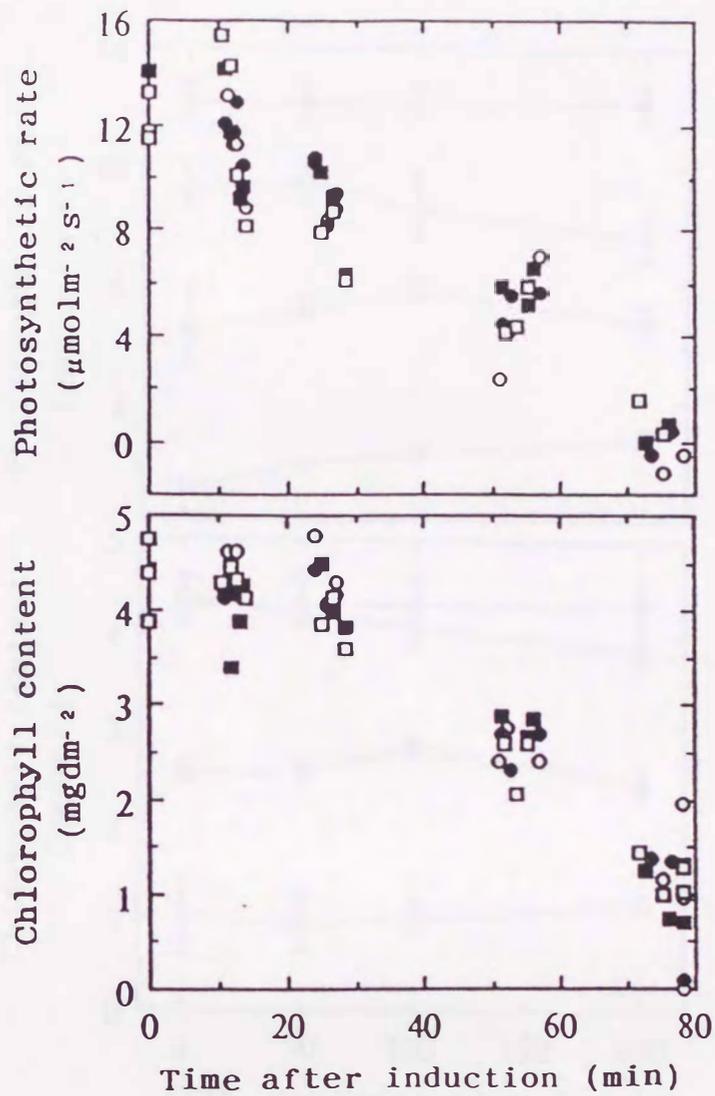


Fig. 54. Changes in photosynthetic rate and chlorophyll content of -Si leaf discs floated on the different  $\text{SiO}_2$  solution after senescence induction. O, 0ppm; ●, 50ppm; ■, 100ppm; □, 200ppm.

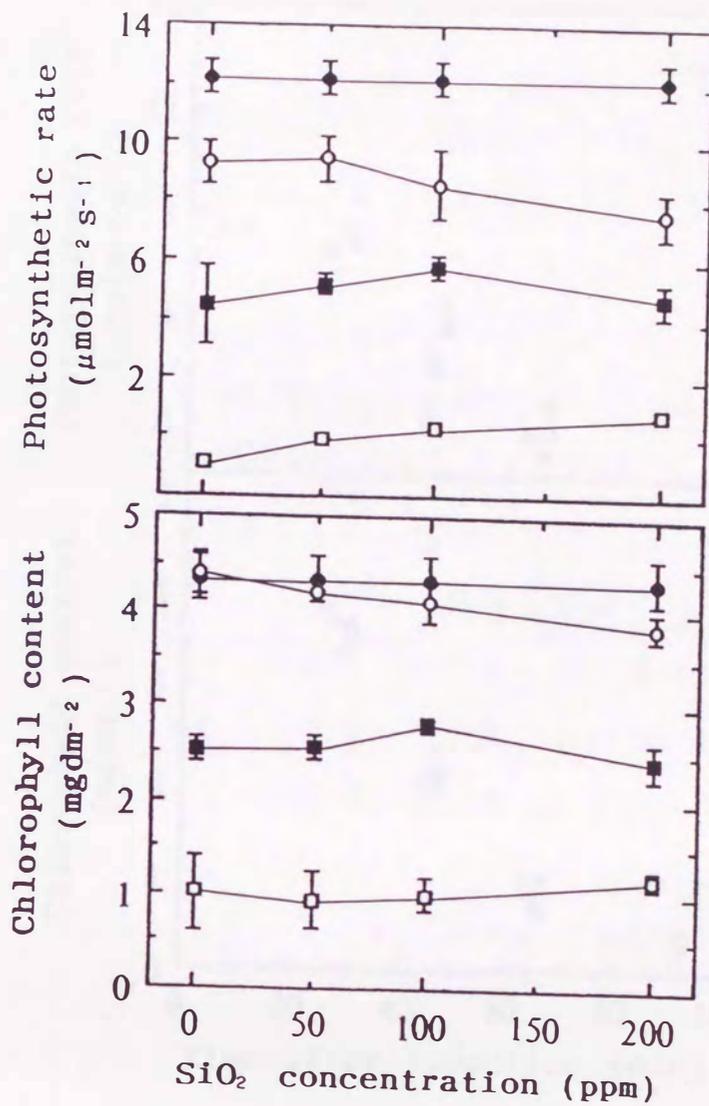


Fig. 55. Effect of SiO<sub>2</sub> concentration on photosynthetic rate and chlorophyll content in -Si leaf discs at 0(●) , 25(○), 55(■) and 78(□) hours after senescence induction.

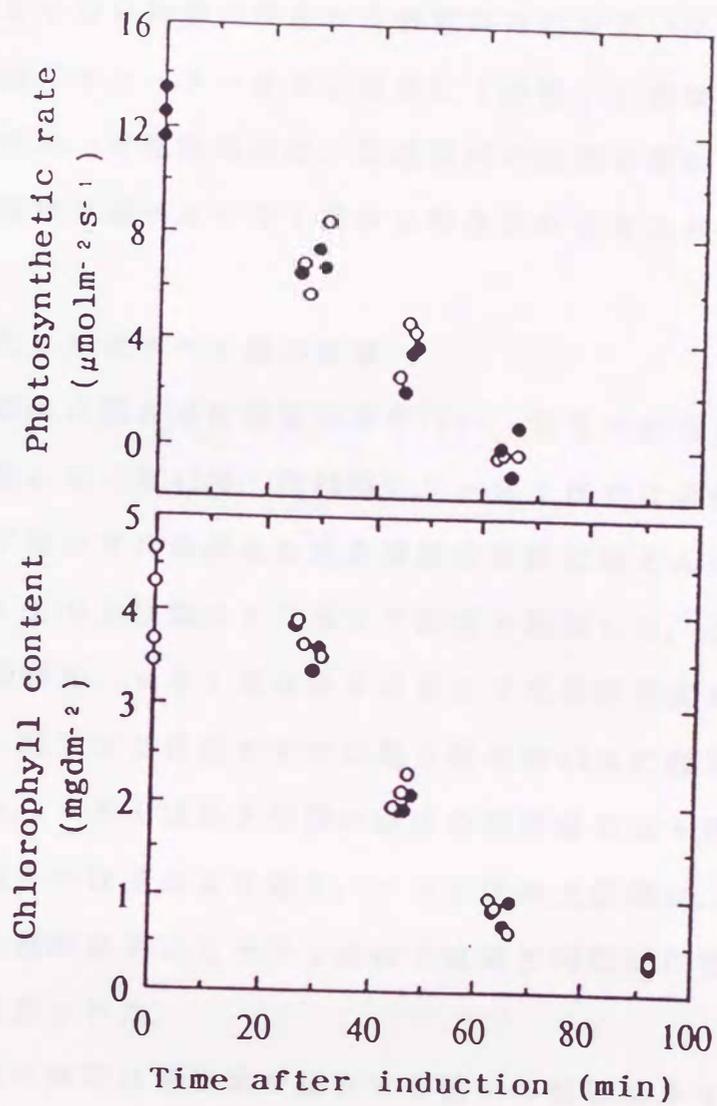


Fig. 56. Changes in photosynthetic rate and chlorophyll content of +Si leaf discs floated on 100 (●) and 0 ppm (○)  $\text{SiO}_2$  solution after senescence induction.

が、老化進行に伴う分解機作が両者で異なることから、分解の進行傾向が一致しない場合もある (Thomas and Stoddart, 1975; Kahanak *et al.*, 1978)。本研究で測定した光合成速度及びクロロフィル含量は、老化誘導時間にともない同様に推移し分解傾向はほぼ同一であった。よって、ここでは両パラメーターをまとめ単に「活性」と表現し以下に考察をすすめる。なお、老化誘導中は、恒温器内の湿度を常に90%以上に維持したため、既章で述べた-Si葉身に懸念される水ストレスはないと考えられる。

#### 1) 個体老化に及ぼすケイ酸の影響

個体全体を暗所に置き老化誘導処理を行い、老化の進行速度をケイ酸処理区間で比較した (第47図, 第48図)。-Si区では老化誘導処理によって上位, 下位いずれの葉身も暗処理後3日目にほとんど枯死したのに対し, +Si区の上位葉は4日目まで活性を維持した。これは下位葉身においても同様で, +Si葉身は3日目まで光合成速度を維持したのに対し, -Si区では2日目ですでに最大値の約50%に低下し3日目に枯死した。また, -Si区の上位葉の活性の維持能力は+Si区の下位葉と同程度かあるいはそれより低く, -Si区の上位葉は, 出葉後1週間で, 出葉後3週間経過した+Si区の下位葉と同程度に老化が進行していることが推定された。

一般に、老化の進行は植物体が産生する種々の植物ホルモンの大きく影響され、特にサイトカイニンが抑制的に、エチレンが促進的に機能することがよく知られる。また、老化に伴う細胞の内容物の分解速度は、水稻体内の蓄積同化産物量及びその再転流能力に左右される (Mae and Ohira, 1981; 山谷, 1994)。したがって、ケイ酸処理区間で老化維持度にみられた2日間の差は、暗処理を開始した時点の蓄積同化産物、窒素 (タンパク質) 及び内生ホルモン含量、あるいは暗所での分解・転流速度における両者の差を表していると考えられる。

また、葉身の抽出直後に暗処理を開始し、第2葉について測定を行ったため、供試葉身は抽出から暗処理直前まで約1週間種々の環境変動の下におかれたと判断される。前章で明らかにしたように、-Si区個体は通常自然条件下でも軽度のストレス状態にあると考えられることから、暗処理の開始時、-Si区ではストレスによってすでに老化が進行していた可能性もある。前述した内生的な維持能力に加え、外的要因に対する耐性の差異が相互に関連しあい、活性維持度の差異となって現れたと考えられる。

また、-Si液で栽培した個体に、老化誘導時にケイ酸処理を行ったところ、低下度にケイ酸の影響はみられなかった。恒温器内の湿度が常に90%以上であったため物理的な蒸散要求が抑えられ、かつ暗処理で気孔閉鎖及び根機能低下が誘導され、ケイ酸の吸収及び体内移動が減少したためと考えられる。これらの結果は、光の存在下でケイ酸を吸収させ、葉身内にある程度蓄積させた場合にケイ酸の老化抑制効果が発現することを意味している。

以上のように、暗黒下においた時の葉身の枯死が-Si区で早く、+Si区では老化抑制効果が認められた。しかし、暗処理以前の乾物生産量が+Si区で高く、窒素を含む体内栄養分及び同化産物蓄積量が両者で異なること、及び-Si区が暗処理以前に軽度のストレスを受けている可能性があることなどから、老化抑制効果を、ケイ酸の効果と限定することは困難である。暗黒処理開始時点の植物体の生理状態の相違によって誘起される要因の影響をなくし、活性維持に対するケイ酸のより直接的な効果を検討するため、ケイ酸を含まない培養液で栽培した個体(-Si区個体)にケイ酸を与える処理(以下、-+)及びケイ酸を含む培養液で栽培した個体(+Si区個体)にケイ酸を欠如する処理(以下、+-)を行い、その後3日間暗処理した光合成速度及びクロロフィル含量を測定した。

+ - 処理の場合，供試した個体は，長期間 + S i 区で栽培したため処理開始時点の内生的な活性維持能力が高く，さらに重合ケイ酸が有する利点，すなわち葉身の直立，病虫害の回避及び高いストレス耐性等を有していると考えられる．ストレス耐性に関しては，処理中，高湿条件においたため環境条件の変動，特に乾燥による細胞膜の損傷は少ないと推定される．よって，+ - 処理に伴う活性維持度の変動は1～3日間のケイ酸欠如期間中に体内に生じた生理的変動を示していると考えられる．

活性維持度は圃場の+ - 処理が長くなるにつれ徐々に低下し，ケイ酸欠如による老化進行の促進が認められた（第50図）．この現象に關与する体内ケイ酸の存在形態を推定するため，葉内重合ケイ酸の指標であるケイ酸体を観察したところ（第52図），+ S i 区葉身では，処理開始時に，葉脈にそう黒線として観察された．線状のケイ酸体像は+ - 処理3日後においても変化がなく，+ - 処理による重合ケイ酸の可溶化・溶脱はほとんどないと判断された．

これらの結果は，葉内にケイ酸が重合し多量に存在している場合においても根系へのケイ酸供給の中断により老化の進行が促進されることを意味する．すなわち，葉身の活性維持のためには可溶性ケイ酸の断続的な供給が不可欠であると考えられる．

一方，- + 処理の場合，供試した個体は長期間 - S i 区で栽培したため，上述した重合ケイ酸の利点をほとんど有せず，さらに生長量における差及び上述の個体老化実験の結果から鑑み処理開始時点の内生的な活性維持能力は，+ S i 区に比べ著しく低いと推定される．

活性維持度は- + 処理にともない急激に上昇し（第51図），ケイ酸を少なくとも1日施用すると長期間 + S i で栽培した個体と同等の維持能力を有することが明らかとなった．ケイ酸体像は処理3日を経過しても観察されず（第52図）ケイ酸の重合はないと判断された．したがって，- + 処理による維持度の増加は，ケイ酸が重合する以前，24時間以内に

起きた体内の生理的変動によって誘発され、その反応には可溶性ケイ酸が関与していると考えられた。

以上の結果から、ケイ酸が老化の進行抑制（活性の維持）に関与していることは明確であると考えられ、しかも関与するケイ酸の形態は未重合の形態であると判断される。

微量サンプル中の可溶性ケイ酸含量の定量は困難であるため、本研究ではケイ酸含量とケイ酸体との関係から老化関連のケイ酸含量の推定を試みた（第53図）。ケイ酸濃度とケイ酸体との間には、有意な正の相関関係（ $Y=0.041+0.000019X$ ;  $r=0.86\cdots$ ）が認められ、葉内ケイ酸含量とケイ酸体は比例関係にあることが明らかとなった。また、この式から、ケイ酸が葉内に0.041%以上蓄積すると、ケイ酸体の形成（ケイ酸の重合）が開始されると判断された。したがって、上述したケイ酸による老化抑制効果は、0.041%以下の未重合のケイ酸が関与していると推定される。

## 2) 葉身老化に対するケイ酸の影響

ここまでは個体全体の老化に及ぼすケイ酸の影響を検討した。上述したように、個体全体の老化の発現・進行は、ホルモン、タンパク質を含む体内蓄積栄養分の大小及び再転流量の影響を受けるため、葉身以外の器官の生理的な状態に大きく左右される。これらの影響を排除し老化に対するケイ酸の直接的な影響及びその作用部位を限定するため、非着生状態の器官の老化を誘導し、老化進行に対するケイ酸の影響を検討した。

切除した緑葉を処理液に浮かべ暗所におくことで老化が誘導され、進行過程の同調性が図れる。また、切除葉身を浮かべる処理液を変え老化の進行度を比較することで特定の物質の老化抑制効果を検討できる（Thomas and Stoddart, 1980）。

葉身の老化に対する直接的なケイ酸の影響を検討するには、ケイ酸を含まない葉身に種々濃度のケイ酸を与え、ケイ酸濃度に伴う生理的変動を比較することが適当と考えられた。そこで、-S i区個体の葉身を切

除しケイ酸濃度が4段階に異なる処理液に葉片を浮かべ、暗黒処理後の活性度の変化を比較した(第54図)。その結果、活性はいずれの処理濃度でも暗処理時間が長くなるにつれ低下したが、低下傾向には処理ケイ酸濃度にもなう差異は認められず、同一直線上で推移した。ケイ酸処理濃度に対し時間ごとにプロットしたところ(第55図)、55及び78時間後の値が処理ケイ酸濃度に伴わずかに増加したが明瞭ではなく、-Si区葉身の老化進行に対するケイ酸の影響は少ないと判断された。

ついで、葉内に蓄積したケイ酸が葉身の老化に及ぼす影響を検討するため、個体老化実験で明確な老化抑制効果がみられた+Si個体から葉身を切除し、-Si及び+Siのケイ酸溶液に葉片を浮かべ活性度の変化を比較した(第56図)。

+Si区の葉身はケイ酸を葉身内に多量に重合蓄積していることから、-Si処理液に浮かべた場合、重合ケイ酸から溶解した遊離の可溶性ケイ酸の影響を検討できると考えられた。従来いわれているように、重合したケイ酸の可溶化・再転流がないなら(石塚・田中, 1952; Yoshida *et al.*, 1962d; Ma *et al.*, 1989)、+Si処理液で老化が抑制されると予想された。葉片の光合成速度及びクロロフィル含量は、暗期処理にともない徐々に低下したが、低下度は両処理液でほとんど同一で、明確な効果は認められなかった。

このように、個体全体の老化には明確にみられたケイ酸の効果が、葉片の老化誘導では消失した。ケイ酸は、葉身が着生状態にある場合に老化を抑制すると考えられる。この結果と、上述した-+処理実験の結果とあわせ考えると、老化抑制の効果は、ケイ酸を経根的に供給した場合に発現すると考えられ、ケイ酸が、根の活性を向上を介し葉身の老化抑制効果に寄与していることが推察される。

根系の活性化による老化抑制効果は、根のサイトカイニン産生量増加の可能性を示唆する(折谷・葭田, 1969・1972; Yoshida and Oritani,

1972・1974)。ケイ酸による根系の生理的機能に対する関与については、根の酸化力向上（奥田・高橋，1962b），暗呼吸速度の増加（東江，1991），根圧の維持（東江ら，1993），及び根の発根量の増加（高橋・柳沢，1958）等が報告されているが，ケイ酸がホルモン産生量に関与するとした報告はない。この点については今後さらに検討する必要があると考えられる。

以上のように，-Si区個体は，内生的な生理的活性の維持能力が低いことが明らかとなった。ケイ酸は，既章で検討した外生的不良環境耐性の向上及び本章で明らかにした内生的活性維持度の上昇を介して葉身の生理的活性の維持に貢献していると考えられる。

## 5. 摘要

乾物生産向上効果の主因と考えられた下位葉身の活性維持に関連して，老化の進行に及ぼすケイ酸の影響を葉身内の重合度とのかねあいから検討した。得られた結果の概要は以下の通りである。

1) 個体全体の老化を誘導した場合，+Si個体の上位及び下位葉における光合成速度及びクロロフィル含量が，-Si個体のそれより1～2日長く維持された（第47図，第48図）。

2) ケイ酸の切り替え処理（-+，+-処理）を行い，ケイ酸処理日数に伴う活性の維持度を比較したところ，+-処理による老化促進効果（第50図）及び-+処理による老化抑制効果が認められ（第51図），ケイ酸が葉身の老化抑制に関与していることが明確になった。

3) ケイ酸の重合度を示すケイ酸体を軟X線を用い観察したところ，-+及び+-の切り替え処理による変化はなく（第52図），上述した老化抑制効果は可溶性のケイ酸の関与を示唆するものであった。

4) ケイ酸体数とケイ酸含量との間には， $Y = 0.041 + 0.000019X$  ( $r = 0.86...$ ) の関係が認められ（第53図），葉内にケイ酸が0.041%以上蓄積

するとケイ酸体が形成されることが推定された。

5) 葉身を切除しケイ酸を葉身に直接与え老化度を検討したところ(第54図, 第55図, 第56図), 明確な老化抑制効果は認められなかった。

6) 以上のことから, 葉身の老化抑制効果は, ケイ酸を経根的に供与した場合に発現することが明らかとなった。また, 葉内ケイ酸体の変動から判断して, 老化抑制効果には可溶性のケイ酸が関与していると考えられた。